

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie

(Direktor: Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian–Albrechts-Universität zu Kiel

**SPEZIFISCHE EXPRESSION VON c-JUN N-TERMINALEN KINASEN
(JNK) IM NERVENSYSTEM
-EINE IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE-**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

JULIANE TONNER

aus Kiel

Kiel, 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. T. Herdegen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Lucius

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 05.10.2009

gez.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Der MAP-Kinase-Signalweg	1
1.1.1 Die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK).....	2
1.1.2 Funktionen der JNK-Isoformen	4
1.2 Intraneuronale Verteilung von JNK-Isoformen	5
1.3 Fragestellungen	8
2. Material und Methoden.....	9
2.1 Tiere und Primärkultur.....	9
2.1.1 Tierzucht	9
2.1.2 Primärkultur	9
2.1.3 Gehirnschnitte	9
2.1.4 Vorbereitung des Gehirnschnitte	9
2.2 Antikörper	10
2.2.1 Primärantikörper	10
2.2.2 Sekundärantikörper	11
2.3 Lösungen und Reagenzien	11
2.4 Immunhistochemie.....	13
2.4.1 Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode)	13
2.4.2 Immunfluoreszenz-Methode	15
2.5 Auswertung der Färbungen.....	16
3. Ergebnisse	18
3.1 Darstellung der Zellkompartimente in neuronaler Primärkultur	18
3.1.1 Darstellung des nukleären Kompartiments mit ATF-2 und DAPI	18
3.1.2 Darstellung des cytoplasmatischen Kompartiments mit ATF-3	18
3.1.3 Darstellung der Mitochondrien mit TOM20.....	18
3.2 Immunhistochemische <i>in vivo</i> Darstellung der neuronalen Strukturen im zentralen Nervensystem.....	20
3.2.1 Nukleäres Signal am Beispiel von c-Jun und ATF-2.....	20
3.2.2 Mitochondriales Signal am Beispiel von GRP 75	20
3.2.3 Axonales Signal am Beispiel von MAP-2	20
3.3 Spezifische Darstellung der JNK Isoformen in Primärkultur von kortikalen Rattenneuronen	23
3.3.1 Gesamt-JNK-Immunreaktivität.....	23

3.3.2 phospho-JNK-Immunreaktivität	23
3.3.3 JNK 1-Immunreaktivität	25
3.3.4 JNK 2/3-Immunreaktivität	25
3.3.5 JNK 1- und phospho-JNK-Immunreaktivität.....	25
3.3.6 Anti-JNK 1/ Anti-JNK 2/3 und Anti-phospho-JNK in Vergrößerung.....	25
3.4 Immunhistochemische <i>in vivo</i> Darstellung der JNK-Isoformen in Gewebe von adultem Wildtyp und JNK-Knockout (KO/-/-).....	27
3.5 Anwendung verschiedener Antikörper gegen JNK-Isoformen im Rattenhirn	30
3.5.1 Gesamt-JNK-Immunreaktivität.....	30
3.5.2 JNK 1-Immunreaktivität	30
3.5.3 JNK 2-Immunreaktivität	30
3.5.4 JNK 2/3-Immunreaktivität	30
3.5.5 JNK 3-Immunreaktivität	30
3.6 Translokation von JNK 2/3-Immunreaktivität nach Schlaganfall	33
3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse	34
4. Diskussion.....	36
4.1 Lokalisation von ATF-2 und c-Jun als Marker für das nukleäre Kompartiment.....	36
4.2 Lokalisation von ATF-3 als Marker für das cytoplasmatische Kompartiment.....	37
4.3 Lokalisation von TOM20 und GRP 75 als mitochondrialer Marker	39
4.4 Lokalisation von MAP-2 als axonaler Marker.....	40
4.5 Immunhistochemische Verteilung der JNK-Isoformen <i>in vitro</i>	40
4.6 Immunhistochemische Darstellung der JNK-Isoformen im Gehirn von adultem Wildtyp-und Knockout-Gewebe	44
4.7 Immunhistochemische Verteilung der JNK-Isoformen in der Ratte	46
4.8 Translokation von JNK 2/3 nach Schlaganfall	48
5. Zusammenfassung.....	49
6. Abbildungsverzeichnis.....	51
7. Tabellenverzeichnis	53
8. Abkürzungsverzeichnis.....	53
9. Literaturverzeichnis	55
10. Danksagung.....	60
11. Lebenslauf.....	61

1. Einleitung

Die c-Jun N-terminal kinases (JNKs) spielen eine wichtige Rolle im zentralen Nervensystem. Sie haben sowohl physiologische Funktionen als auch pathologisch-degenerative Eigenschaften (Übersicht Waetzig und Herdegen 2005). Entscheidend für das Verständnis dieser unterschiedlichen Wirkungen ist u.a. die intrazelluläre Verteilung der JNK-Isoformen. Eine gute Möglichkeit für die Lokalisierung bietet die Immunhistochemie. Diese Darstellungsform ist in bisherigen Veröffentlichungen nur ungenügend vertreten. Das Thema dieser Arbeit befasst sich daher mit dem Versuch der spezifischen *in vivo* Lokalisation der JNKs an Mäuse- und Rattenhirnschnitten sowie an primären Neuronen.

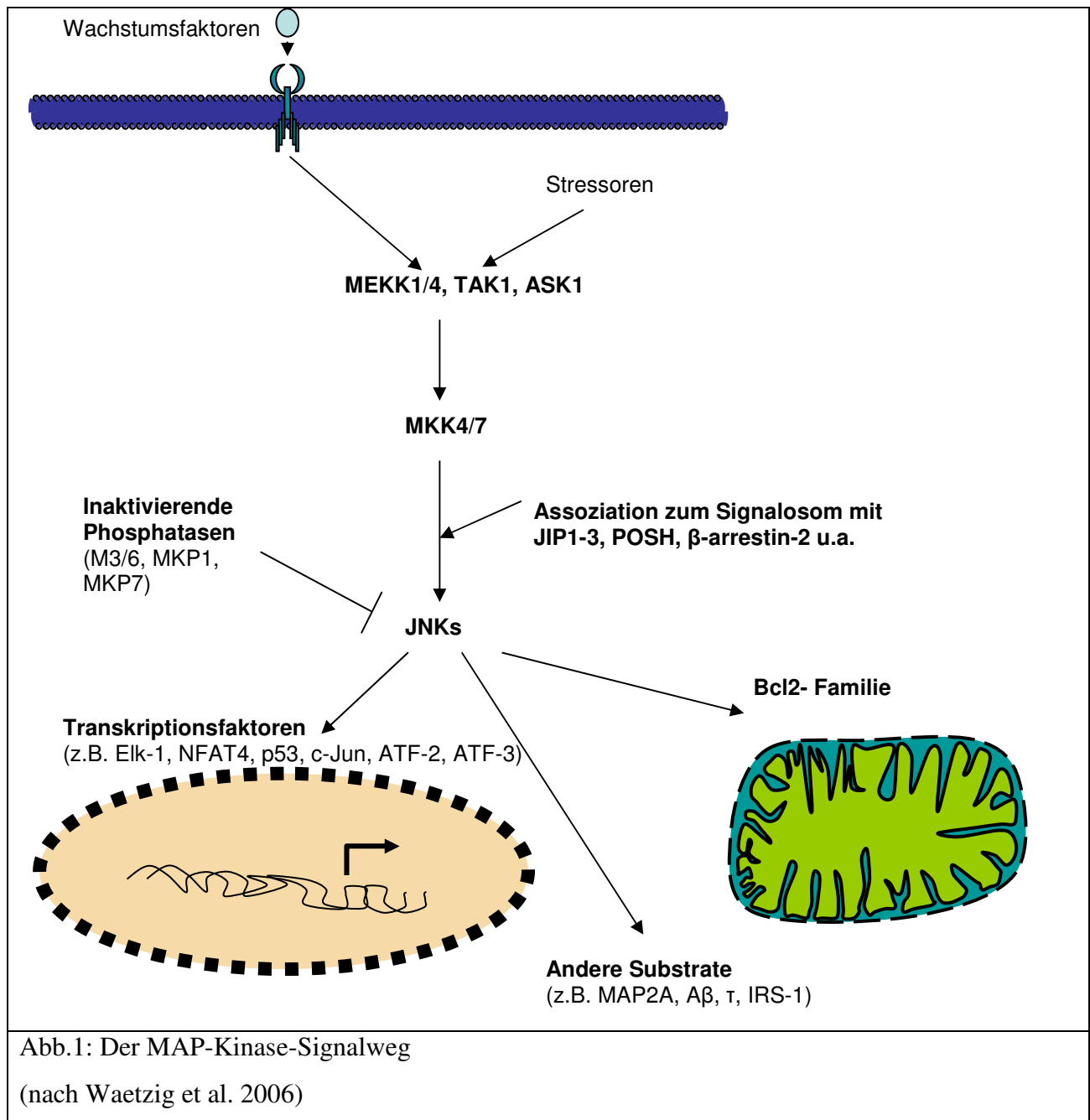
1.1 Der MAP-Kinase-Signalweg

JNKs werden den Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) zugeordnet. Die Gruppe der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) gehört dabei zu den bekanntesten Signalweg-Familien. MAPK kommen bei den Eukaryonten ubiquitär vor. Es sind Prolin-gerichtete Serin/Threonin-Proteinkinasen, die Einfluss auf verschiedene zelluläre Prozesse wie z.B. Proliferation, Initiierung und Verbreitung von Entzündungsprozessen, Zellzyklus-Regulation und programmierten Zelltod haben.

Durch sie werden über verschiedene Signalkaskaden wichtige Verbindungen zwischen externen Stimuli wie UV-Bestrahlung (Luo et al. 2001), Nahrungsentzug (Dean und Cartee 2000), Wachstumsfaktoren (Douville und Downward 1997) und Zytokinen (Raingeaud et al. 1995, McCubrey et al. 2000) einerseits und den Substraten andererseits übertragen.

Es wurden bisher vier Hauptgruppen von MAP-Kinasen identifiziert:

- Extrazellulär Signal-regulierte Kinasen (ERKs = extracellular signal-regulated kinases)
- ERK5/große MAP-Kinasen (BMK= ERK/bigMAPK) (Widmann et al. 1999)
- p38 MAP-Kinasen
- Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK = stress-activated protein kinase) oder c-Jun N-terminale Kinasen (JNK= c-Jun N-terminal kinase).



1.1.1 Die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK)

Die c-Jun N-terminalen Kinasen, eine der Hauptgruppen der MAP-Kinasen, werden auch Stress-aktivierte Proteinkinasen genannt.

Wie aus dem Namen bereits hervorgeht, wird die Signalkaskade der JNKs durch Stresseinwirkungen aktiviert und kann Apoptose, Tumortransformation, Differenzierung, Immunreaktionen, Inflammation oder Adaptation hervorrufen. Bisher sind 3 JNK Gene, *jnk1*, *jnk2* und *jnk3* bekannt. Durch alternatives Splicing am C-terminalen Ende entstehen 46-kDa und 54-kDa Isoformen der JNK 1, JNK 2 und JNK 3. Weiterhin gibt es für die Gene *jnk1* und

jnk2 ein α - und ein β -Exon. Ebenfalls durch alternatives Splicen wird posttranskriptional eines davon aus der mRNA eliminiert. Die Exons liegen in der Kinase-Domäne des JNK-Proteins, was eine unterschiedliche Substratspezifität nach sich zieht (Gupta et al. 1996).

Insgesamt sind also 10 verschiedene Isoformen bekannt, je vier für JNK 1 und JNK 2 und zwei für JNK 3 (Übersicht Waetzig und Herdegen 2005).

Über TNF-Rezeptoren, IL-1-Rezeptoren oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren wird die JNK-Signalkaskade (Abb. 1) aktiviert. Intrazellulär erfolgt die Weiterleitung der MAP-Signalkaskade über ein dreistufiges hierarchisches System aus Protein-Phosphorylierungsprozessen. An oberster Stelle stehen dabei die MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MAP3K oder MEKK). Zu diesen gehören die MEKK1-4, ASK1, TAK1 und die MLKs, außerdem die Rho GTPasen Rac und Cdc42 (Waetzig et al. 2006). Durch Serin/Threonin-Doppelphosphorylierung aktivieren sie die MAP-Kinase-Kinasen (MAP2K oder MKK). Die JNKs werden letztendlich durch Threonin/Tyrosin-Doppelphosphorylierung innerhalb eines konservierten Motivs ihrer Kinasedomäne aktiviert, was wiederum durch Mitglieder der MAP2Ks, MKK4 und MKK7, katalysiert wird (Chang und Karin 2001).

Eine Möglichkeit der Regulation erfolgt über die dual-spezifischen Phosphatasen MKP-1, M3/6 und MKP7, welche die JNKs dephosphorylieren und somit inaktivieren können. In diesem Zusammenhang sind noch die sog. Brückenproteine (Scaffolds) zu erwähnen, die spezifisch an Komponenten des Signalweges binden, so dass eine Interaktion der Kinasen erst ermöglicht bzw. erleichtert wird. Bisher bekannt sind dabei JIP1-3 (JNK-interacting-proteins), POSH und β -arrestin-2. Sie nehmen eine weitere Kontrollposition innerhalb der Signalkaskade ein.

Die Substrate der JNKs befinden sich in der gesamten Zelle, einschließlich Dendriten, Axone und präsynaptische Endigungen (Björkblom et al. 2005, Coffey et al. 2002, Chang et al. 2003, Tararuk et al. 2006). Zu den wichtigsten Substraten gehören die Transkriptionsfaktoren im Zellkern, dazu zählen neben Elk-1, NFAT4, p53, die Proteine ATF-2 (activating transcription factor 2) und c-Jun (Kallunki et al. 1996). c-Jun, wie auch ATF-2, ist eine Komponente des AP-1 (activator protein 1) Transkriptionsfaktorkomplex und wird durch Phosphorylierung an den Serinresten 73 und 63 seines Aminoterminus aktiviert. Der Transkriptionsfaktor AP-1 besteht aus Proteindimeren, die sich aus Kombinationen der verschiedenen Mitgliedern der Jun-, Fos- und ATF-Proteinfamilien zusammensetzen. Die AP-1 Phosphorylierung führt zu einer verstärkten Expression von Genen, die AP-1-Bindestellen in ihrem Promotor aufweisen.

Zielgene sind dabei zum einen c-Jun selbst, zum anderen weitere Gene, die in Zellaktivierung, Proliferation, Differenzierung und Tod involviert sind (Übersicht Herdegen und Leah 1998).

1.1.2 Funktionen der JNK-Isoformen

Die JNKs sind wichtige Regulatoren für physiologische und pathologische Prozesse im Körper. Sie spielen eine Rolle bei zahlreichen Krankheiten wie zum Beispiel Diabetes mellitus, Atherosklerose, Schlaganfall, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer (Zhu et al. 2001, Borsello und Forloni 2007).

Während JNK 1 und JNK 2 ubiquitär im Körper vorkommen, wird JNK 3 nur im Testis, Herz und im Gehirn exprimiert (Kyriakis und Avruch 2001).

Für alle 3 Isoformen zeigt sich eine dichotome Funktionsweise. Die einerseits apoptotisch-degenerativen, andererseits physiologisch-regenerativen Eigenschaften der JNKs werden hier nur im ZNS beschrieben.

JNK 1 spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Gehirns. Es sorgt beispielsweise für eine korrekte Formation der vorderen Kommissur und kontrolliert eine intakte Cytoarchitektur durch die Phosphorylierung der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs) (Chang et al. 2003). Bei Ischämie-Ereignissen vermittelt JNK 1 zellulären Schutz durch u.a. Expression von Hitzeschock-Proteinen (Nakagomi et al. 2003).

JNK 2 ist wichtig für die physiologische Hirnentwicklung (Kuan et al. 1999, Chang et al. 2003). Es wird auf der anderen Seite durch apoptotische Stimuli vermehrt aktiviert (Coffey et al. 2002). Dabei sorgt es für eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und aktiviert Cathepsin.

JNK 3 ist die Isoform, die hauptsächlich mit neuronaler Degeneration und Apoptose in Verbindung gebracht wird (Brecht et al. 2005, Kuan et al. 2003). Deletion von JNK 3 reduziert die Stress-induzierte JNK-Aktivität und schützt außerdem vor den Folgen nach cerebraler Ischämie. Bei Stress-induzierter Apoptose in PC12-Zellen, eine periphere neuronale Zelllinie aus Ratten, wird allerdings ein positiver Einfluss von JNK 3 auf das Auswachsen der Neuriten beschrieben (Waetzig und Herdegen 2003). Auch in primären Neuronen steigt die Expression von JNK 3 während des Auswachsens an (Eminet et al. 2008). Dies deutet auch hier auf physiologische Wirkungen hin.

Genau wie die unterschiedlichen Funktionen der JNK-Isoformen, ist auch ihr Vorkommen innerhalb der Zelle und ihrer Kompartimente verschieden.

Tabelle 1: Expression und Induktion von JNK-Isoformen

Zellphysiologie	JNK1	JNK2	JNK3
Expression im Körper	ubiquitär	ubiquitär	Testis, Herz, Gehirn
basale Aktivität	konstitutiv	gering	gering
Lokalisation im Zellkern	konstitutiv	bei Stimulation	bei Stimulation
Lokalisation an den Mitochondrien	konstitutiv	konstitutiv und Zunahme nach zellulären Stress	

Diese Veränderungen sind bisher in der Literatur allerdings selten mit immunhistochemischen Bildern belegt worden. Vor allem im Gehirn gibt es nur wenig und sehr widersprüchliche Ergebnisse mit zellulärer Auflösung, woraus sich auch die Fragestellung dieser Arbeit ergeben hat.

1.2 Intraneuronale Verteilung von JNK-Isoformen

Bei der *in vitro* Färbung kortikaler Neurone zeigt sich nach Glutamat-Stimulation ein deutlicher Anstieg von JNK 1/2 im Zellkern. Es wurden dabei Antikörper verwendet, die nicht isoformspezifisch sind, da sie sowohl für JNK 1 als auch für JNK 2 eine Immunreaktivität hervorrufen. Während basal das cytoplasmatische Signal überwiegt, ist dieses nach Stress geringer (Jiang et al. 2002). Für das phosphorylierte JNK 1/2 zeigen sich basal sowohl cytoplasmatische als auch nukleäre Signale, nach Glutamat kommt es in beiden Kompartimenten zu einer Zunahme des Signals, vermehrt dabei im Nukleus (Jiang et al. 2002).

Färbungen an fixierten cerebellären Neuronen zeigen cytoplasmatische Signale für JNK 1, die dabei sehr granuliert erscheinen. Anti-JNK 2/3 ruft eine Immunreaktivität von JNK 2 und JNK 3 hervor und zeigt eine deutliche diffuse Färbung im Nukleus (Coffey et al. 2002). Es wird daraus geschlossen, dass der nukleäre Transkriptionsfaktor c-Jun selektiv das Ziel von JNK 2/3 ist und nicht von JNK 1, welches im Cytoplasma zurückgehalten wird. Es zeigt sich allerdings das Problem der diffusen Färbung von JNK 2/3, was möglicherweise durch eine

unspezifische Erkennung anderer Antigene durch den verwendeten Antikörper entstehen kann; im Westernblot werden dabei keine unspezifischen Banden beobachtet.

Im Zusammenhang mit Morbus Alzheimer zeigen Zhu et al. 2001 die unterschiedliche Verteilung von phospho-JNK im Hippocampus (CA1-Kerngebiet). Die JNK-Aktivität, und somit die Translokation in den Zellkern, steigt zu Beginn der Erkrankung an; später, bei schon fortgeschrittener Krankheit, kommt es dann zu einer Rückverteilung ins Cytoplasma.

Auch bei Ferrer et al. 2003 ergibt sich bei den phospho-JNK Färbungen nach MCAO ein nukleäres Signalmuster im Bereich kortikaler Neurone.

Rick Meeker und Alda Fernandes (2000) zeigen einen Vergleich der Immunreaktivität von JNK 2 und JNK 3 im Bereich der neuroendokrinen Zellen des Nucleus supraopticus von Ratten. Es werden Kontrollen und Tiere gegenübergestellt, denen für 44 Stunden die Wasseraufnahme vorenthalten wurde. Während JNK 2 in den Kontrollen ein mäßiges Signal zeigt, wird die Färbung nach Wasser-Deprivation intensiver. JNK 3 ist in den Kontrollen nur schwach vorhanden, in den Versuchstieren kommt es vor allem im Zellkern zu einem Anstieg. In den Pyramidenzellen des dorsalen Cortex kommt es nach Wasser-Entzug bei JNK 2 zu einer gleichen oder verminderten Intensität der Färbung, die JNK 3-Immunreaktivität steigt im Zellkern und Cytoplasma.

Zhang et al. 1998 zeigt in hippocampalen Neuronen eine eindeutige stressabhängige Translokation von JNK 3 in den Nukleus. Während JNK 3 basal ein cytoplasmatisches Signal gibt, wird nach MCAO eindeutig das nukleäre Zellkompartiment angefärbt.

Tabelle 2: Ausgewählte Veröffentlichungen der JNK-Isoformen und phospho-JNK *in vitro* und *in vivo*

Neuronale Struktur	Stimulus	Antikörper	1. Basal 2. nach Stimulation		Referenz
			Cytoplasma	Nukleus	
Cortikale Neurone (<i>in vitro</i>)	Glutamat	JNK 1/2 (Promega, 1:200)	1. +++ 2. ++	1. + 2. +++	Jiang et al. 2002
		phospho-JNK 1/2 (Promega, 1:100)	1. + 2. ++	1. + 2. +++	
Cerebelläre Neurone (<i>in vitro</i>)	Entzug von Wachstums Faktoren	JNK 1 (Pharmingen, monoklonal, 0,5µg/ml)	1. ++ 1. +	1. 0 1. ++	Coffey et al. 2002
		JNK 2/3 (Upstate, polyklonal, 0,2µg/ml)			
Hippocampale Neurone	Aß-Stimulation	phospho-JNK (New England Biolabs, 1:300, polyklonal)	1. 0 2. 0	1. 0 2. ++	Zhu et al. 2002
Cortikale Neurone/ Striatum	MCAO	phospho-JNK (Cell-Signaling, 1:100, polyklonal)	1. 0 2. 0	1. 0 2. ++	Ferrer et al. 2003
Neuro-endokrine Zellen des N. supraopticus	Wasser-deprivation	JNK 2 (Upstate Biotechnology, 1:1000)	1. + 2. ++	1. 0 2. +	Meeker und Fernandes 2000
		JNK 3 (Upstate Biotechnology, 1:2000)	1. + 2. +	1. + 2. ++	
Dorsale cortikale Neurone	Wasser-deprivation	JNK 2 (Upstate Biotechnology, 1:1000)	1. + 2. +	1. + 2. +	Meeker und Fernandes 2000
		JNK 3 (Upstate Biotechnology, 1:2000)	1. + 2. ++	1. + 2. +++	
Hippocampale Neurone	MCAO	JNK 3 (Upstate Biotechnology, 1:100)	1. + 2. 0	1. 0 2. +++	Zhang et al. 1998

Semiquantitative Beschreibung der Veränderungen: 0 kein Signal, + mäßiges Signal, ++ starkes Signal, +++ sehr starkes Signal

Zusammenfassend zeigt die Tabelle 2 deutlich die noch bestehenden Widersprüche der Ergebnisse in der Literatur. Für die phospho-JNK-Immunreaktivität ergibt sich ein eher nukleäres Muster nach Stimulation, basal werden sowohl cytoplasmatische als auch nukleäre als auch keine Signale beschrieben.

JNK 1 befindet sich basal im cytoplasmatischen Kompartiment. Bei der Färbung mit Antikörpern gegen JNK 1 und JNK 2 zeigt sich basal auch ein Signal im Zellkern, das nach Stimulation zunimmt, während die Immunreaktivität im Cytoplasma abnimmt. Man kann hier aber durch die verwendeten Antikörper nicht von einer spezifischen JNK 1 Färbung ausgehen, so dass Ergebnisse nicht eindeutig und schwer zu vergleichen sind.

Auch bei JNK 2 sind die Ergebnisse nicht eindeutig. Es besteht immer eine basale cytoplasmatische, nicht immer jedoch eine gleichzeitig nukleäre Immunreaktivität. Ebenso nach Stimulation divergieren die Resultate.

JNK 3 befindet sich nach Stimulation im Zellkern, basal lassen sich unterschiedliche Aktivitäten nachweisen. Uneinheitlich sind auch die Ergebnisse bei der Betrachtung des cytoplasmatischen Zellkompartiments. Im Ruhezustand ist stets ein mäßiges Signal im Cytoplasma vorhanden. Nach Stimulation zeigen sich sowohl Anstieg als auch Gleichbleiben als auch Abfall der JNK 3-Immunreaktivität.

Bei keiner dieser Veröffentlichungen wurde die Spezifität kontrolliert, zum Beispiel in Form von Färbungen an Knockouttieren, außerdem fällt auf, dass neben Kern und Cytoplasma keine weiteren Kompartimente untersucht wurden.

1.3 Fragestellungen

Für die Darstellung des spezifischen JNK-Isoform-Nachweises sollen folgende Fragestellungen untersucht werden.

1. Wie stellen sich die einzelnen Zellkompartimente in neuronalen Zellen immunhistochemisch dar?
2. Sind die JNK-Antikörper spezifisch?
3. Wie stellen sich die einzelnen Zellkompartimente in Gehirnschnitten dar?
4. Wie sind die JNK-Isoformen *in vivo* intrazellulär verteilt?
5. Wie zeigen sich mögliche JNK-Translokationen unter Stress?

2. Material und Methoden

2.1 Tiere und Primärkultur

2.1.1 Tierzucht

Es wurden neugeborene oder adulte Wistar-Ratten, C57BL/6-Wildtyp-Mäuse und JNK-knockout-Mäuse (Brecht et al. 2005) aus der Zucht der Zentralen Tierhaltung (ZTH) des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, verwendet.

2.1.2 Primärkultur

Bei den Primärkulturen, die für mich von Dr. Sevgi Eminel vorbereitet wurden, handelte es sich um cortikale Rattenneurone. Neugeborenen Ratten (0 bis 2 Tage nach Geburt) wurde nach Dekapitation das Gehirn entfernt, der Kortex abgetrennt und neuronale Zellen kultiviert. Das Gewebe wurde nach einem leicht modifizierten Protokoll von Namgung (2000) aufbereitet und ausgesät. Die Zellen wurden 7 Tage in Kultur gehalten und schließlich mit 4% Paraformaldehyd fixiert (Eminel et al. 2008).

2.1.3 Gehirnschnitte

Die Gehirne der 200 g schweren männlichen Wistar Ratten wurden mir in 4%iger Paraformaldehydlösung bereitgestellt.

Die Tiere waren dabei entweder unbehandelt, oder es waren Schlaganfälle induziert worden (Patzner et al. 2008).

Die Gehirne der C57BL/6-Wildtyp-Mäuse und JNK-knockout-Mäuse wurden ebenfalls in 4%iger Paraformaldehydlösung bereitgestellt.

Sowohl bei den Ratten als auch bei den Mäusen wurden nur adulte Tiere verwendet.

2.1.4 Vorbereitung des Gehirnschnitte

Die Gehirne wurden für eine Nacht in 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Zur Kryoprotektion wurden die Gehirne für 3-5 Tage in eine 30%ige Saccharose-Lösung gelegt.

Das Gehirn wurde dann bei -20°C eingefroren, und anschließend wurden im Leica Mikrotom 40 µm dicke Schnitte hergestellt. Es wurden dabei entweder jeweils 3-6 Schnitte in je ein Loch einer 24-well-Platte, die mit 0,1% Paraformaldehyd gefüllt waren, verteilt (free-floating-Methode), oder es wurden je 3 Schnitte auf Objektträger aufgezogen und bei -20° eingefroren.

2.2 Antikörper

2.2.1 Primärantikörper

Antikörper	Firma	Artikelnummer	Herkunftstier	Verdünnung
JNK 1	Santa Cruz	sc-1648	Maus	1:100-8000
JNK 2	Santa Cruz	sc-7345	Maus	1:100-8000
JNK 2	Upstate	#06-749	Kaninchen	1:100
JNK 2/3	Upstate	#06-748	Kaninchen	1:200
JNK 3	Upstate	#05-893	Kaninchen	1:200
Gesamt-JNK	Cell Signaling	#9252	Kaninchen	1:50-200
phospho-JNK	Promega	V793B	Kaninchen	1:100
phospho-JNK	Biolabs	#9255S	Kaninchen	1:100

c-Jun	Santa Cruz	sc-16777	Kaninchen	1:100
ATF-2	Santa Cruz	sc-187	Kaninchen	1:600
ATF-3	Santa Cruz	sc-188	Kaninchen	1:600

MAP-2	Chemicon International	MAB 3418	Maus	1:200
MAP-2	Chemicon International	AB5622	Kaninchen	1:200

TOM20	Santa Cruz	sc-11415	Kaninchen	1:100
GRP 75	StressGen	SPS-825	Maus	1:100

NeuN	Chemicon	MAB377	Maus	1:100
------	----------	--------	------	-------

2.2.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Färbung	Artikelnummer	Herkunftstier	Verdünnung
Anti-Maus IgG	Axxora	DAB	VC-6102-KI1	Ziege	Nach Hersteller
Anti- Kaninchen IgG	Axxora	DAB	VC-6102-KI1	Ziege	Nach Hersteller
Anti-Maus IgG	Jackson	Immunfluoreszenz (rot, Cy3)	115-165-003	Ziege	1:100
Anti- Kaninchen IgG	Invitrogen	Immunfluoreszenz (grün, Alexa-488)	A11008	Ziege	1:100

2.3 Lösungen und Reagenzien

DAB-Protokoll

10x PBS (Phosphate Buffered Saline): 80 g NaCl (Sigma), 11,5 g Na₂HPO₄ (Merck), 2 g KH₂PO₄ (Merck) und 2 g KCl (Merck) werden mit destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wird dann in einer 1:10-Verdünnung (1x PBS) angewendet.

10x PBST (PBS Triton): Zu 998 ml 10x PBS werden 2 ml Octoxinol-9 (Triton® X-100; Sigma) gegeben. Die Lösung wird in einer 1:10-Verdünnung (1x PBST) angewendet.

Permeabilisierungslösung: 0,1% (v/v) Octoxinol-9 (Triton X-100; Sigma) und 0,1% (w/v) Citronensäuremonohydrat (Merck) in PBS gelöst.

Blocklösung: 1% (v/v) NGS (Normal Goat Serum, Vector) in PBST gelöst.

ABC-Lösung: Vectastain Elite ABC Reagenz (Vector Laboratories). In 5 ml PBST werden 2 Tropfen der Reagenz A und 2 Tropfen der Reagenz B gelöst. Die Lösung wird 30 min vor dem Gebrauch hergestellt.

DAB-Lösung: Eine 10 mg 3,3'-Diaminobenzidine-Tetrahydrochlorid-Tablette (Sigma)

wird in 15 ml PBST gelöst. Dazu werden 12 µl 30%ige Wasserstoffperoxidlösung zugefügt. Vor Gebrauch wird die Lösung durch einen 0,2 µm-Filter filtriert.

Immunfluoreszenz-Protokoll

10x PBS (Phosphate Buffered Saline): 80 g NaCl (Sigma), 11,5 g Na₂HPO₄ (Merck), 2 g KH₂PO₄ (Merck) und 2 g KCl (Merck) werden in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wird dann in einer 1:10-Verdünnung (1x PBS) angewendet.

Permeabilisierungslösung: 0,1% (v/v) Octoxinol-9 (Triton X-100; Sigma) und 0,1% (w/v) Citronensäuremonohydrat (Merck) in PBS gelöst.

Blocklösung: 1% (w/v) BSA (Bovine Serum Albumin, Fluka) in PBS gelöst.

TBS (Tris Buffered Saline): 50 mM Tris (Merck), 1 M NaCl (Sigma)

TBST: 0,1% (v/v) Polysorbat 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan monolaurat; Tween 20) in TBS gelöst.

Demaskierungslösung: 0,1% (w/v) Na-Citrat und 0,1% (v/v) Polysorbat 20 (Tween 20) in PBS gelöst.

Sudanschwarz (zum Quenching der Autofluoreszenz): 1% (w/v) Sudanschwarz (Roth) in 70% (v/v) Ethanol gelöst. Im Rahmen der Sudanschwarz-Blockierung wird vorher und nachher in 20% (v/v) Ethanol und 70% (v/v) Ethanol inkubiert.

Roti-Immunoblock (Roth): 1 ml Roti-Immunoblock mit 1 ml 10x TBS ad 10 ml

Blocklösung: 0,1% (w/v) BSA(Fluka) und 0,2% (w/v) Glycin wurden in TBS gelöst.

2.4 Immunhistochemie

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbungen beruht auf der Affinität von Antikörpern zu bestimmten Antigenen im Gewebe, die dadurch spezifisch markiert werden können. Voraussetzung für den immunhistochemischen Nachweis von Antigenen im Gewebe ist die Erhaltung der Antigene, was durch optimale Fixation erreicht werden kann.

Es stehen zum einen polyklonale Antikörper, die von verschiedenen Plasmazelllinien stammen, zum anderen monoklonale Antikörper zur Verfügung. Polyklonale Antikörper reagieren aufgrund ihrer Heterogenität mit verschiedenen Epitopen, so dass es zu falsch-positiven Immunreaktionen kommen kann, generell aber eine positive Färbung mit größerer Verlässlichkeit gelingt. Monoklonale Antikörper sind nur gegen eine bestimmte antigene Determinante gerichtet, was dadurch zu einer höheren Spezifität führt.

Die Darstellung erfolgt mit Hilfe von verschiedenen Detektionssystemen, die an den Antikörper gekoppelt sind und somit sein Vorhandensein im Präparat sichtbar machen.

Dies kann durch die direkte Färbemethode dargestellt werden, bei der das zu untersuchende Antigen direkt mit einem spezifischen Antikörper zusammengebracht wird, welcher mit einem Enzym oder Fluorochrom (Detektionssysteme) konjugiert ist.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Anwendung der indirekten Färbemethode. Dabei dient ein bereits gebundener Primärantikörper als Zielpunkt für einen Sekundärantikörper. Dieser wiederum ist ebenso mit einem Chromogen oder Fluorochrom gekoppelt und kann dadurch im Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Hier wurden zum einen die Avidin-Biotin-Methode, zum anderen die Darstellung mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen angewendet, beides indirekte Methoden.

2.4.1 Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode)

Die ABC-Methode basiert auf der starken Affinität von Avidin bzw. Streptavidin zu Biotin. An den Primärantikörper, der direkt gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet ist, bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper. Dieser ist in einer anderen Spezies als der Primärantikörper hergestellt worden und erkennt somit den Fc-Teil des Primärantikörpers. Zunächst wird ein Komplex aus Avidin und biotinyliertem Enzym gebildet. Avidin besitzt insgesamt vier Bindungsstellen, die aufgrund molekularer Struktur nicht alle besetzt werden. Es kommt im Folgenden zu einer Amplifikation des Signals, denn die freien Bindungsstellen

am Avidin binden an das Biotin des biotinylierten Sekundärantikörpers. Dadurch entsteht ein Komplex aus enzymmarkiertem Avidin-Biotin-Complex mit biotinyliertem Sekundärantikörper (ABC-Methode). Die Antigen-Antikörper-Reaktion wird letztendlich durch eine Enzym-Substratreaktion sichtbar gemacht. Das verwendete Enzym, häufig Merrettichperoxidase, reagiert mit Wasserstoffperoxid als Substrat. Dabei wird Wasserstoff frei, der das zuvor nahezu farblose 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu einem braunen Endprodukt reduziert. Dieses kann schließlich mit der Lichtmikroskopie ausgewertet werden

Durchführung

Zur Durchführung befinden sich 2-3 Schnitte in je einem Loch der 24-well-Platten.

1. Die Schnitte werden zunächst 3x 10 Minuten mit PBST gewaschen, um die Reste des Paraformaldehyds zu entfernen.
2. Dann erfolgt eine Inkubation für 5 Minuten in der Permeabilisierungslösung (0,1% Octoxinol-9 (Triton X-100; Sigma) und 0,1% Citronensäuremonohydrat (Merck) in PBS gelöst.), um das Eindringen der Antikörper zu verbessern.
3. Daraufhin wird mit der Blocklösung (1% NGS) für 30 Minuten gewaschen, mit dem Ziel, unspezifische Proteine zu blockieren.
4. Es wird erneut 5 Minuten mit PBST gewaschen.
5. Der **Primärantikörper**, in PBST gelöst, wird schließlich für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
6. Zur vollständigen Entfernung des Primärantikörpers wird 3x mit PBST gewaschen (5 Minuten, 10 Minuten, 30 Minuten).
7. Dann erfolgt die Inkubation mit dem in PBST gelösten **biotinylierten Sekundär-Antikörper** für 45 Minuten bei Raumtemperatur.
8. Daraufhin wird 3x 5 Minuten mit PBST gewaschen.
9. Die Inkubation mit der **AB-Lösung der Vectastain-Kits** wird 45 Minuten durchgeführt. Die Lösung wird 30 Minuten vor Gebrauch nach Anweisung vorbereitet.
10. Dann erneut 3x 5 Minuten mit PBST waschen.
11. Mit der **DAB-Lösung** wird schließlich für 10-30 Minuten inkubiert, wobei die ausreichende Färbung unter dem Mikroskop kontrolliert wird.
12. Die Färbung wird dann mit destilliertem Wasser gestoppt und noch 3x 5 Minuten

gewaschen.

13. Die Schnitte werden auf die Objektträger aufgezogen, getrocknet, kurz in Xylol getaucht und mit Pertex eingedeckelt.

2.4.2 Immunfluoreszenz-Methode

Hier wird ein anderes Detektionssystem verwendet, um die Antikörper sichtbar zu machen. An den spezifischen Primärantikörper bindet ein Sekundärantikörper, der mit einem fluoreszierenden Chromogen gekoppelt ist. Die Fluoreszenzfarbstoffe unterscheiden sich in charakteristischen Anregungs- und Emissionsspektren.

Die hier verwendeten Cy3-Antikörper werden mit grünem Licht angeregt und emittieren im roten Bereich des Spektrums, die Alexa 488-Antikörper werden mit blauem Licht angeregt und erscheinen im grünen Bereich.

Durch entsprechende Kombinationen der Primär- und Sekundärantikörper sind Doppelfärbungen möglich. DAPI (in Prolong Gold Antifade) bindet an DNA und emittiert bei Excitation mit UV-Licht im blauen Bereich Licht.

Durchführung

Die Färbungen werden in 24-well Platten mit je 2-3 Schnitten pro Loch durchgeführt.

Protokoll 1:

1. Die Schnitte werden mit der Blocklösung (1% BSA in PBS) 5 Minuten gewaschen.
2. Dann wird der Primärantikörper, der in 1% BSA in PBS gelöst wird, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
3. Um den Primärantikörper vollständig zu entfernen, wird 3x 5 Minuten mit PBS gewaschen.
4. Daraufhin wird der Sekundärantikörper, der ebenso in 1% BSA in PBS gelöst wird, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte müssen dabei und bei den folgenden Schritten abgedunkelt gelagert und bearbeitet werden, um Verluste der Fluoreszenzwirkung zu verhindern.
5. Schließlich wird 3x 5 Minuten mit PBS gewaschen.
6. Die Schnitte werden dann auf die Objektträger aufgezogen und mit ProLong Gold eingedeckelt, was eine zusätzliche Färbung der Zellkerne zur Folge hat.

2.5 Auswertung der Färbungen

Ausgewertet werden die Ergebnisse am Leica DMR mit den Filterwürfeln N2.1 (grün Excitation, rot Emission), I3 (blau Excitation, grün Emission), A (UV Excitation, blau Emission). Die Fotos werden dabei mit einer CC-12 Kamera (Olympus SiS) aufgenommen. Gespeichert und verarbeitet wird mit dem analySIS 5.0.

Unter den Abbildungen im Ergebnisteil wird jeweils die verwendete Objektivvergrößerung beschrieben, z.B. 63x, die korrekte Vergrößerung lautet dann z.B. 630x bei einem 10x Okular und einem Optovar von 1.

Optimierungsversuche

Die Optimierungsversuche beziehen sich auf die Immunfluoreszenzfärbungen.

Protokoll 2:

1. Die Schnitte werden 5 Minuten mit der Demaskierungslösung (0,1% Na-Citrat und 0,1% Tween 20 in PBS gelöst) gewaschen.
2. Dann erfolgt eine Blockierung mit Sudanschwarz, um die Autofluoreszenz zu verringern. Es wird zunächst für 2 Minuten mit 20% Ethanol, dann für 2 Minuten mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend wird 10 Minuten mit 1% Sudanschwarz in 70% Ethanol gefärbt, dann mit 70% Ethanol geklärt, bis keine Farbwolken mehr abgegangen sind, daraufhin folgt erneutes Waschen für 2 Minuten mit 20% Ethanol und schließlich wird 2x 5 Minuten in TBS inkubiert.
3. Anschließend wird in der Blockierungslösung (0,1% BSA und 0,2% Glycin werden in TBS gelöst) mindestens 1 Stunde inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu verhindern.
4. Eine weitere Blockierung erfolgt für 30 Minuten mit dem Roti-Immunoblock 1:10 in TBS.
5. Dann wird der Primärantikörper (Verdünnung in der Blockierungslösung) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
6. Beim folgenden Waschen wurde zunächst 2x 5 Minuten TBS-T (TBS-0,1% Tween20) verwendet, danach 3x 10 Minuten TBS.
7. Die Sekundärantikörper, der in der Blockierungslösung gelöst wird, wird für 1 Stunde inkubiert.
8. Daraufhin erfolgt erneutes Waschen. Siehe Punkt 6.

9. Abschließend wird kurz mit Aqua dest. gewaschen.

10. Die Schnitte werden auf die Objektträger aufgezogen und mit ProLong Gold eingedeckelt.

Im Vergleich zu Protokoll 1 wird bei Protokoll 2 TBS anstatt PBS als Puffer verwendet. Außerdem soll durch das Sudanschwarz die Autofluoreszenz vermindert werden.

Im Protokoll 1 wird noch variiert, indem zu Beginn der Färbung nach 3 maligem Waschen mit PBS (jeweils 5 Minuten) mit Triton X-100 (5 Minuten) gewaschen, dann mit 1% NGS geblockt wird (30 Minuten).

3. Ergebnisse

3.1 Darstellung der Zellkompartimente in neuronaler Primärkultur

Das Ziel war es, spezifische Färbungen an Primärkulturen von cortikalen Rattenneuronen durchzuführen. Es wurden zunächst Antikörper verwendet, die die unterschiedlichen Zellkompartimente darstellen. Diese Ergebnisse sollten als Grundlage für die *in vivo* JNK-Darstellungen dienen, um dort eine genaue Differenzierung der Lokalisation vorzunehmen und Translokationen sicher beschreiben zu können.

3.1.1 Darstellung des nukleären Kompartiments mit ATF-2 und DAPI

ATF-2 (activating transcription factor 2) gehört zu den Komponenten des AP-1 (activator protein 1) Transkriptionsfaktorkomplexes.

Das blaue DAPI-Signal ist spezifisch für den Zellkern. Man erkennt deutlich, dass das grüne ATF-2 Signal ebenfalls fast ausschließlich im Nukleus zu finden ist (Abb. 2).

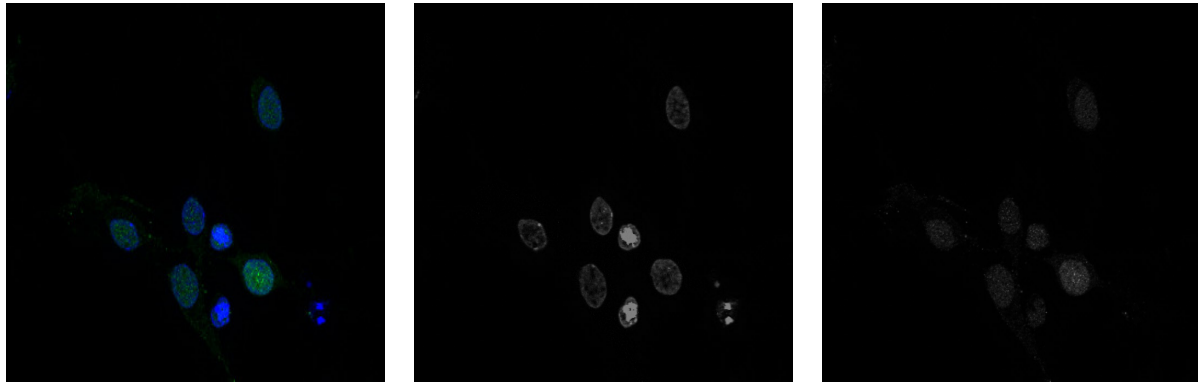
Ein Beispiel für ein nukleäres Signal liefert daher die Färbung mit ATF-2.

3.1.2 Darstellung des cytoplasmatischen Kompartiments mit ATF-3

Ein Beispiel für eine cytoplasmatische Färbung wurde mit dem ATF-3 Antikörper umgesetzt (Abb. 3). Es ist eine eindeutige Abgrenzung zur spezifischen DAPI-Färbung im Zellkern zu sehen. Obwohl ATF-3 zu den Transkriptionsfaktoren (activating transcription factor 3) gehört, die ihre Wirkung im Nukleus entfalten, zeigt diese Färbung mit ATF-3 eine cytoplasmatische Verteilung. Dies ist typisch für Basalbedingungen. Erst nach Stimulation transloziert ATF-3 in den Zellkern. Als Substrat von JNKs kann ATF-3 als Marker für JNK-Translokationen verwendet werden.

3.1.3 Darstellung der Mitochondrien mit TOM20

TOM20 ist ein mitochondrialer Marker. TOM20 befindet sich in der äusseren Membran der Mitochondrien. Abb. 4 zeigt eine typische mitochondriale Verteilung. Der Zellkern ist frei, im Cytoplasma und in den Neuriten erkennt man dünne, längliche Strukturen, die eine Akkumulierung von Mitochondrien wiedergeben.

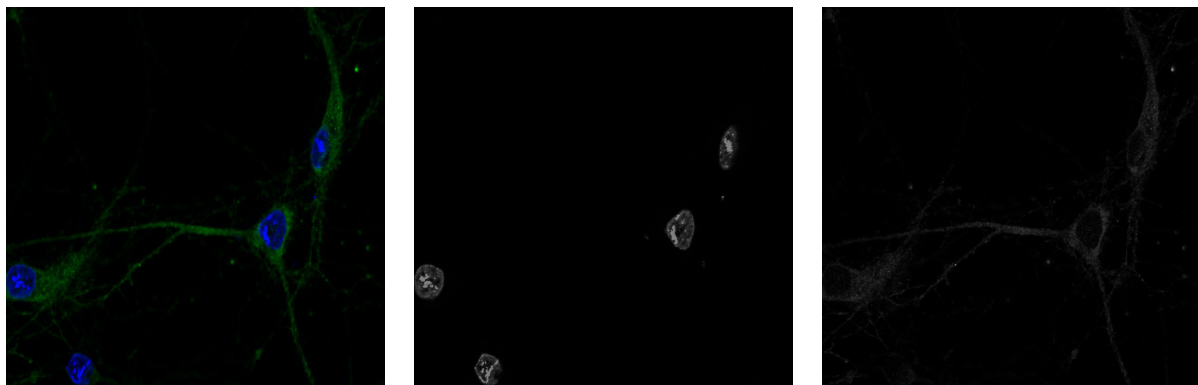


ATF-2/ DAPI

DAPI

ATF-2

Abb. 2: ATF-2 in primären cortikalen Neuronen als Beispiel für ein nukleäres Signal (1:600; grün), DAPI (blau), 63x, Protokoll 1

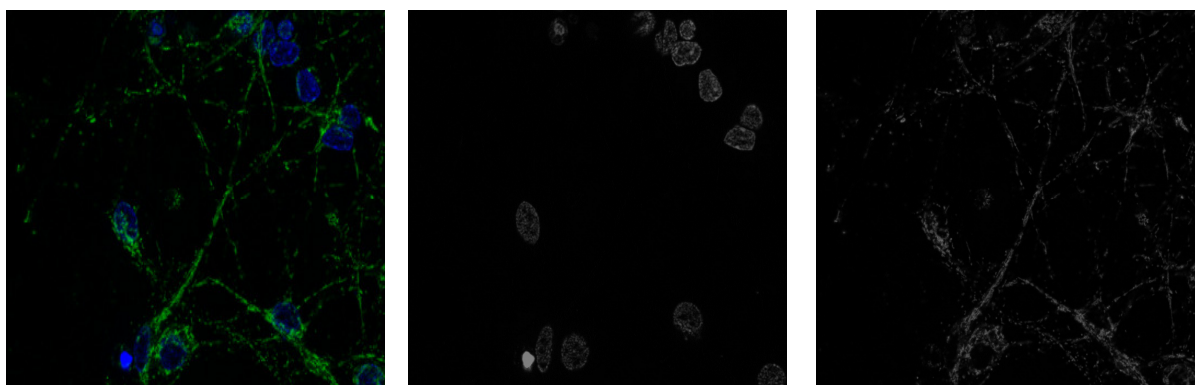


ATF-3/ DAPI

DAPI

ATF-3

Abb. 3: ATF-3 in primären cortikalen Neuronen als Beispiel für ein cytoplasmatisches Signal (1:600; grün), DAPI (blau), 63x, Protokoll 1



TOM20/ DAPI

DAPI

TOM 20

Abb. 4: TOM20 in primären cortikalen Neuronen als Beispiel für ein mitochondriales Signal (1:100; grün), DAPI (blau), 63x, Protokoll 1

3.2 Immunhistochemische *in vivo* Darstellung der neuronalen Strukturen im zentralen Nervensystem

Um die Lokalisation der JNK-Isoformen *in vivo* zu zeigen, ist es unter anderem notwendig zu wissen, wie sich die Färbungen der einzelnen Zellkompartimente *in vivo* darstellen. Aus diesem Grund werden in diesem Abschnitt verschiedene Antikörperfärbungen vorgestellt, bei denen nukleäre, mitochondriale, cytoplasmatische und axonale *in vivo* Signale immunhistochemisch markiert werden.

Die Färbungen wurden an 40 µm dicken Rattenhirnschnitten durchgeführt, betrachtet wurde dabei ausschließlich die Cortexregion. Es wurde sowohl die Immunfluoreszenz- als auch die DAB-Methode angewendet.

3.2.1 Nukleäres Signal am Beispiel von c-Jun und ATF-2

Diese c-Jun-Färbung in Abb. 5 wurde nach dem DAB-Protokoll angefertigt. Man erkennt eindeutig die nukleären Signale in den cortikalen Zellen.

Bei der c-Jun-Immunfluoreszenzfärbung in Abb. 6 ist trotz eines ebenfalls starken Hintergrundsignals ein nukleäres Signal zu erkennen.

In Abb. 7 wurde wiederum das DAB Protokoll angewendet. Auch ATF-2 ist eindeutig nukleär lokalisiert und veranschaulicht auch bei der *in vivo* Darstellung ein deutliches Signal im Zellkern.

3.2.2 Mitochondriales Signal am Beispiel von GRP 75

GRP 75 ist ein mitochondriales Antigen, das sich in der mitochondrialen Matrix befindet. In Abb. 8 sieht man ein deutliches Signal im Cytoplasma, fortgehend in die Axone, wie es für Mitochondrien zu erwarten ist.

3.2.3 Axonales Signal am Beispiel von MAP-2

In der Abb. 10, die mit dem MAP-2-Antikörper hergestellt wurde, erkennt man ein eindeutiges axonales Signal.

MAP-2 (microtubule associated protein 2) ist ein neuronales Marker-Phosphoprotein, das die Stabilität von Mikrotubuli, die neuronale Morphogenese und die cytoskelettale Dynamik in Axonen und Dendriten reguliert.

Auch mit der DAB-Färbemethode (Abb. 9) ist die axonale MAP-2 Färbung zu reproduzieren.

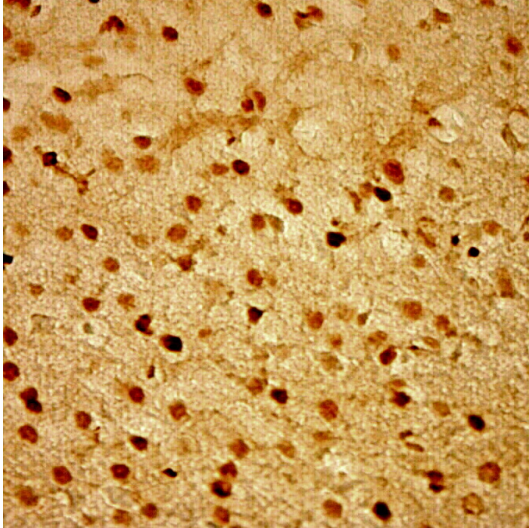


Abb. 5: *In vivo* c-Jun Färbung am Rattenhirnschnitt als Beispiel für ein nukleäres Signal (1:100, 40x, DAB-Protokoll)

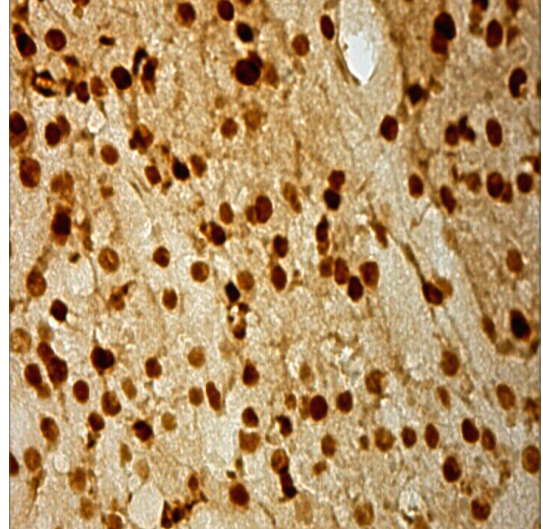


Abb. 7: *In vivo* ATF-2 Färbung am Rattenhirnschnitt als Beispiel für ein nukleäres Signal (1:100, 40x, DAB-Protokoll)

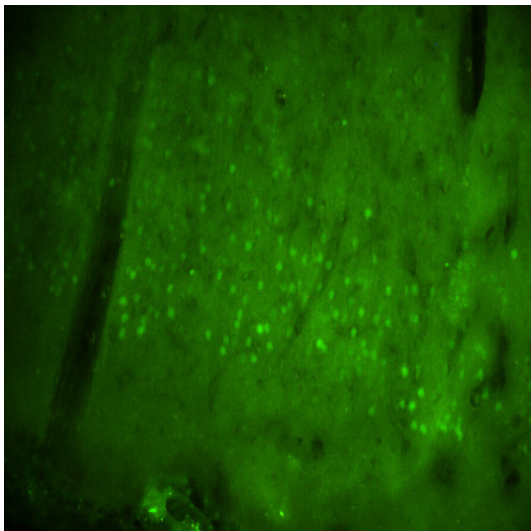


Abb. 6: *In vivo* c-Jun Färbung am Rattenhirnschnitt als Beispiel für ein nukleäres Signal (1:100, 20x, Protokoll 1)

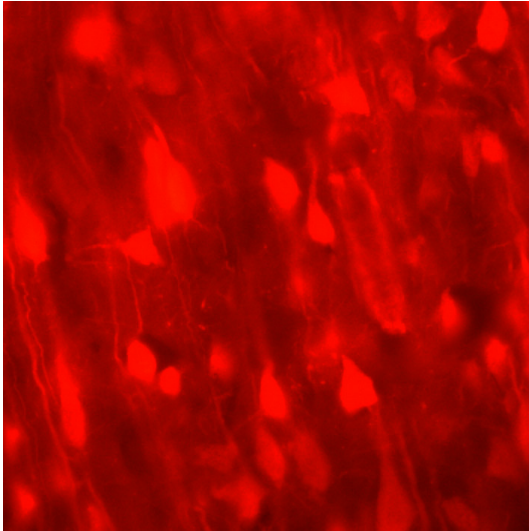


Abb. 8: *In vivo* GRP 75 Färbung am Rattenhirnschnitt als Beispiel für ein mitochondriales Signal (1:100, 40x, Protokoll 2)

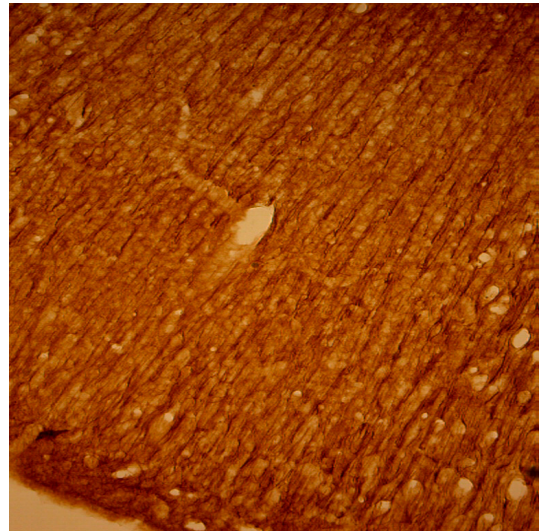


Abb. 9: *In vivo* MAP-2 Färbung am Rattenhirnschnitt als Beispiel für ein axonales Signal (1:200, 10x, DAB-Protokoll)

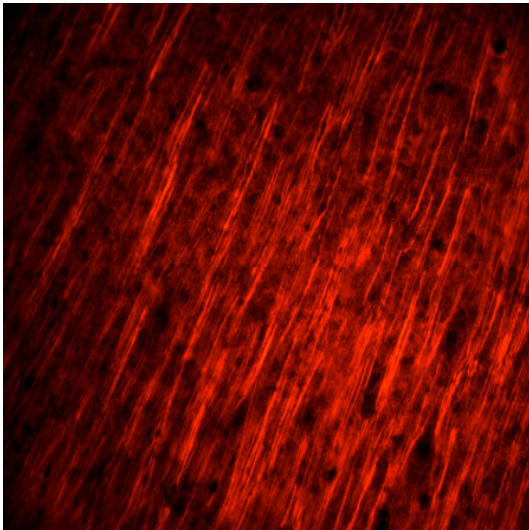


Abb. 10: *In vivo* MAP-2 Färbung am Rattenhirnschnitt als Beispiel für ein axonales Signal (1:200, 20x, Protokoll 1)

3.3 Spezifische Darstellung der JNK Isoformen in Primärkultur von cortikalen Rattenneuronen

3.3.1 Gesamt-JNK-Immunreaktivität

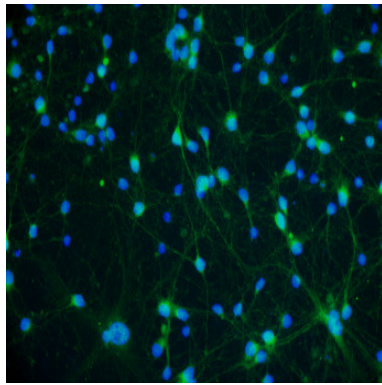
Anti-Gesamt-JNK stellt alle JNK-Isoformen (JNK 1, 2 und 3) gemeinsam dar.

In den Abb. 11 und Abb. 12 erkennt man jeweils Gesamt-JNK-Färbungen in unterschiedlicher Vergrößerung.

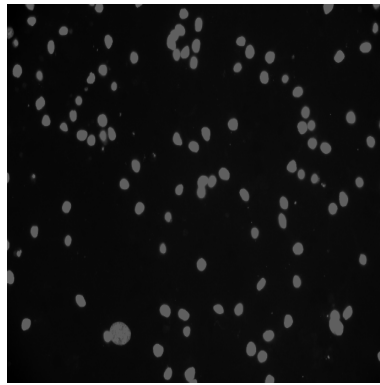
Man sieht eine Abgrenzung zwischen dem cytoplasmatischen grünen Signal und der blauen DAPI-Färbung, eine schwache grüne Färbung erkennt man aber auch im Zellkern. Welche der Isoformen allerdings für die jeweiligen Signale im Cytoplasma und im Nukleus verantwortlich sind, geht daraus nicht hervor.

3.3.2 phospho-JNK-Immunreaktivität

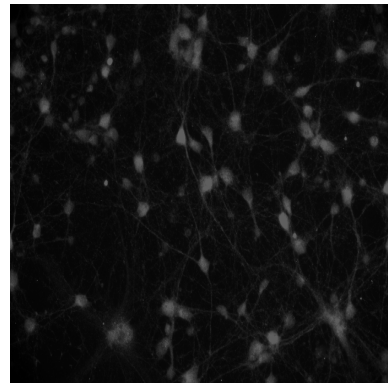
Die Abb. 13 zeigt eine phospho-JNK Färbung. Phospho-JNK ist die phosphorylierte Form von JNK und markiert alle phosphorylierten JNK-Isoformen. Man erkennt ein eindeutig nukleäres Signal, das Cytoplasma ist nur sehr schwach angefärbt. Vergleicht man die Intensität der Signale der Gesamt-JNK-IR und phospho-JNK-IR im Kern, zeigt sich für phospho-JNK ein stärkeres Signal, trotzdem die Menge aus der Gesamt-JNK-IR hervorgeht und somit nicht stärker sein dürfte. Möglicherweise liegt die Ursache dabei in einer unterschiedlichen Affinität der Antikörper zu den entsprechenden Antigenen.



Anti-Gesamt-JNK/ DAPI

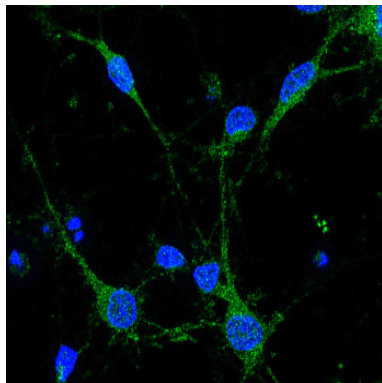


DAPI

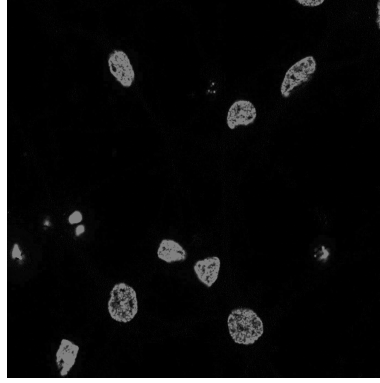


Anti-Gesamt-JNK

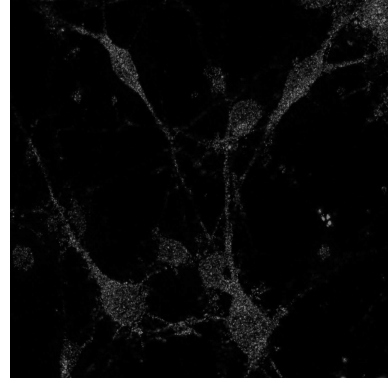
Abb. 11: Anti-Gesamt-JNK in Primärkultur von cortikalen Neuronen (1:100; grün), DAPI (blau), 20x, Protokoll 1



Anti-Gesamt-JNK/ DAPI

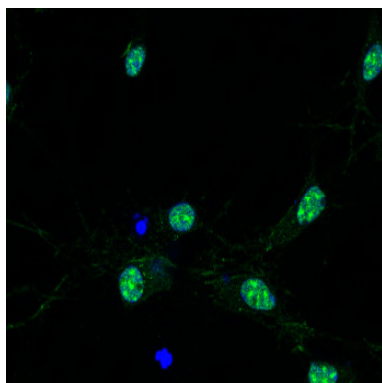


DAPI

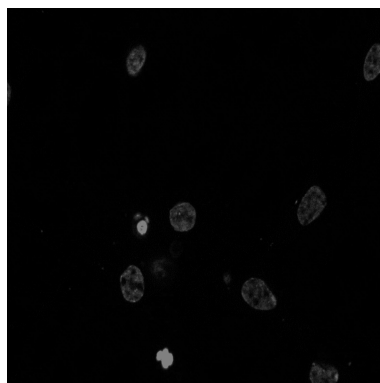


Anti-Gesamt-JNK

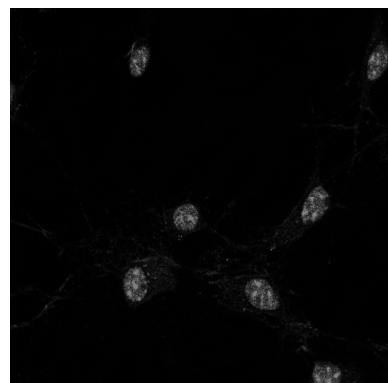
Abb. 12: Anti-Gesamt-JNK an Primärkultur von cortikalen Neuronen (1:100; grün), DAPI (blau), 63x, Protokoll 1



Anti-phospho-JNK/ DAPI



DAPI



Anti-phospho-JNK

Abb. 13: Anti-phospho-JNK an Primärkultur von cortikalen Neuronen (1:100; grün), DAPI (blau), 63x, Protokoll 1

3.3.3 JNK 1-Immunreaktivität

In Abb. 14 sieht man eine Färbung mit einem Antikörper gegen JNK 1.

Anti-JNK 1 zeigt unter Basalbedingungen hauptsächlich eine cytoplasmatische Signalanreicherung und nur ein schwaches Signal im Nukleus.

3.3.4 JNK 2/3-Immunreaktivität

Anti-JNK 2/3 färbt JNK 2 und JNK 3 gemeinsam an.

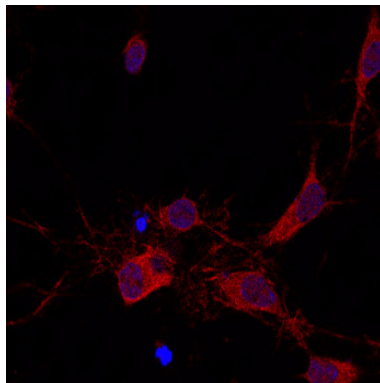
Neben dem deutlichen cytoplasmatischen Signal durch JNK 2/3 erkennt man auch ein grünes, teilweise granuliertes Signal im Nukleus (Abb. 15).

3.3.5 JNK 1- und phospho-JNK-Immunreaktivität

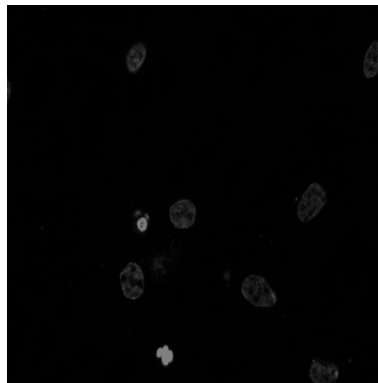
Die Abb. 16 zeigt eine Doppelfärbung der obigen Einzelfärbungen von anti-JNK 1 und anti-phospho-JNK. Aufgrund der nur sehr schwachen Kolo-kalisation der beiden Antikörper im Zellkern, entsteht das phospho-JNK im Nukleus folglich nicht aus der JNK 1 Isoform. Und gleichermaßen kann man daraus schließen, dass JNK 1 im Cytoplasma nicht in phosphorylierter Form auftritt, da auch hier nur eine geringe Kolo-kalisation zu sehen ist.

3.3.6 Anti-JNK 1/ Anti-JNK 2/3 und Anti-phospho-JNK in Vergrößerung

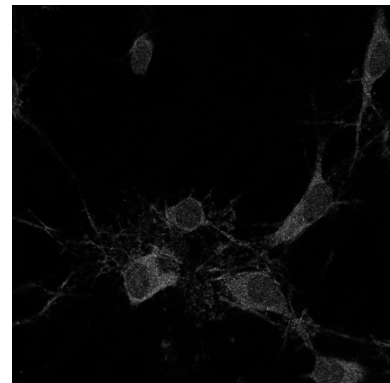
In der vergrößerten Darstellung (Abb. 17) der Ergebnisse mit Antikörpern gegen JNK 1, JNK 2/3 und phospho-JNK stellt sich die Verteilung der JNK-Isoformen im Zellkern noch deutlicher dar. JNK 1 zeigt dabei einen unwesentlich angefärbten Nukleus, während dieser bei JNK 2/3 vermehrt granuliert erscheint. Diese granulierten Bereiche sind auch in der phospho-JNK-Färbung wiederzuerkennen, so dass eine Kolo-kalisation von JNK 2/3 und phospho-JNK im Zellkern nahe liegt. Zu diskutieren ist dabei allerdings die deutlich stärkere Färbung von p-JNK im Vergleich zur JNK 2/3 Färbung, so dass hier möglicherweise unspezifische Bindungen das Bild beeinflussen.



Anti-JNK 1/ DAPI

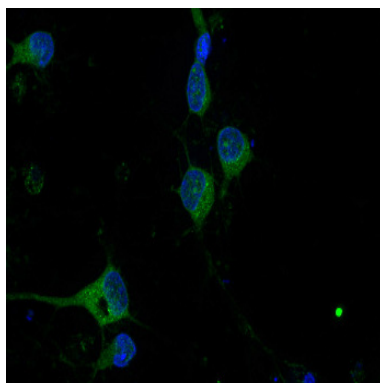


DAPI

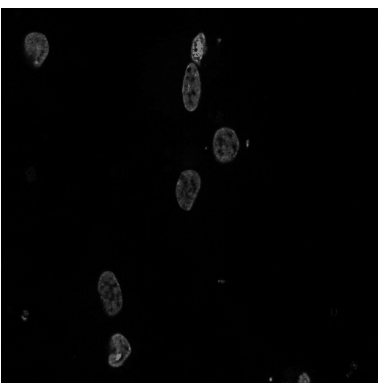


Anti-JNK 1

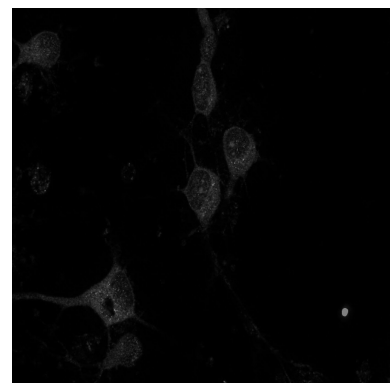
Abb. 14: Anti-JNK 1 an Primärkultur von corticalen Neuronen (1:100; rot), DAPI (blau), 63x, Protokoll 1



Anti-JNK 2/3/ DAPI

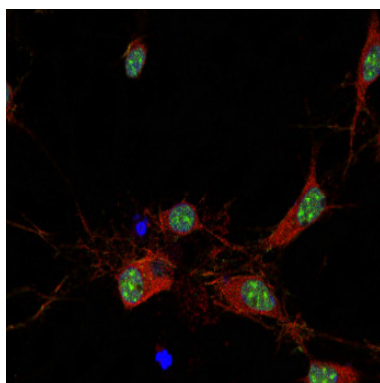


DAPI

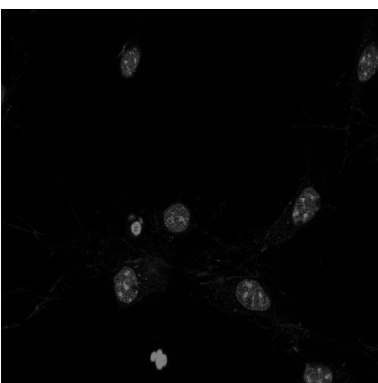


Anti-JNK 2/3

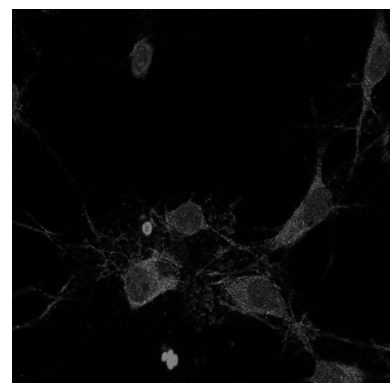
Abb. 15: Anti-JNK 2/3 an Primärkultur von corticalen Neuronen (1:100; grün), DAPI (blau), 63x, Protokoll 1



Anti-JNK 1/ Anti-phospho-JNK/ DAPI



Anti-phospho-JNK/ DAPI



Anti-JNK1/ DAPI

Abb. 16: Anti-JNK 1 (1:100; rot) / Anti- phospho-JNK (1:100; grün), Doppelfärbung an Primärkultur von corticalen Neuronen, DAPI (blau), 63x, Protokoll 1

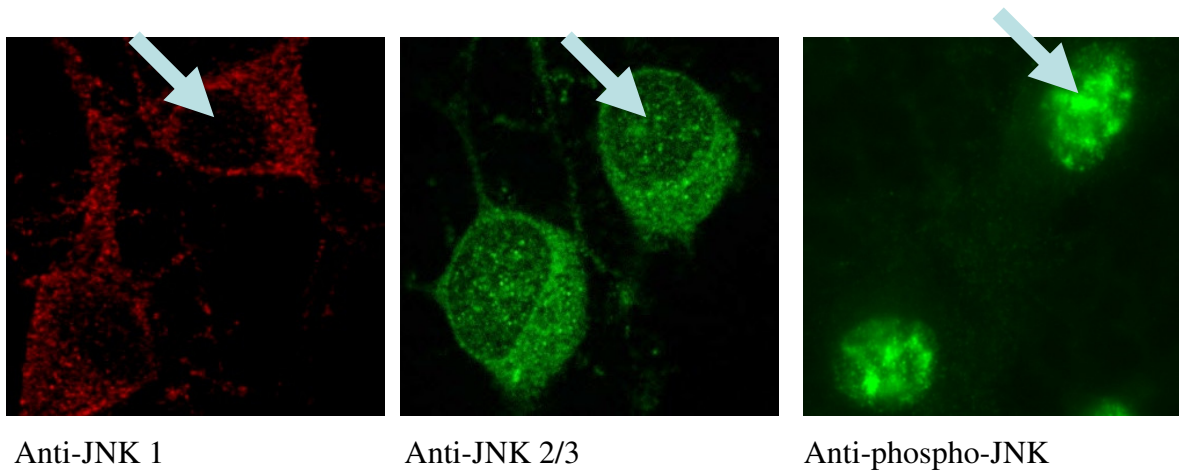


Abb. 17: Vergrößerte Darstellung der JNK-Isoformen an primären cortikalen Neuronen; Pfeile markieren den Zellkern, Vergrößerung 200x

3.4 Immunhistochemische *in vivo* Darstellung der JNK-Isoformen in Gewebe von adultem Wildtyp und JNK-Knockout (KO/ -/-)

In den Knockout-Tieren werden mittels genetischer Manipulation gezielt ein oder mehrere Gene deaktiviert. In diesem Fall werden JNK 1, 2 oder 3 Knockout-Mäuse verwendet. Dadurch ist es möglich, die Spezifität der verwendeten Antikörper genau zu prüfen, da z.B. im JNK 1 Knockout der JNK 1 Antikörper kein Signal geben sollte. Entsprechend gilt dies auch für die anderen Isoformen.

Sowohl bei der Immunfluoreszenz- als auch bei der DAB-Methode zeigen alle 3 laut Hersteller JNK-Isoform-spezifischen Antikörper keine spezifischen Signale, da immer auch im KO-Gewebe Signale zu erkennen sind. Bei der Immunfluoreszenz-Methode erscheinen die Signale der JNK 2 und JNK 3 Isoformen im Wildtyp (Abb. 22/26) in einem ähnlichen, hauptsächlich nukleärem Verteilungsmuster. Dagegen ergibt der JNK 1-Antikörper eine eher cytoplasmatische Verteilung, bei der der Zellkern weniger stark gefärbt ist (Abb. 18). Aber auch im KO-Gewebe lassen sich Signale darstellen, bei denen nicht eindeutig ist, ob diese spezifisch sein könnten oder ob es sich um unspezifische Hintergrundsignale handelt (Abb. 19/23/27). Dies deutet auf eine mangelnde Spezifität der Antikörper, denn die Hintergrundsignale wären ein Zeichen dafür, dass die Antikörper an unspezifische Strukturen binden.

Bei der DAB-Färbung mit dem Antikörper gegen JNK 1 ist die Spezifität im Wildtyp und KO-Gewebe fraglich. Die DAB-Färbungen sind zudem insbesondere bei JNK 2 und JNK 3 (Abb. 24/25 und 28/29) sehr schwach.

Abb. 18-29: Verschiedene JNK-Antikörper im Cortex von JNK-defizienten Mäusen und Wildtyp-Kontrollen

Wildtyp

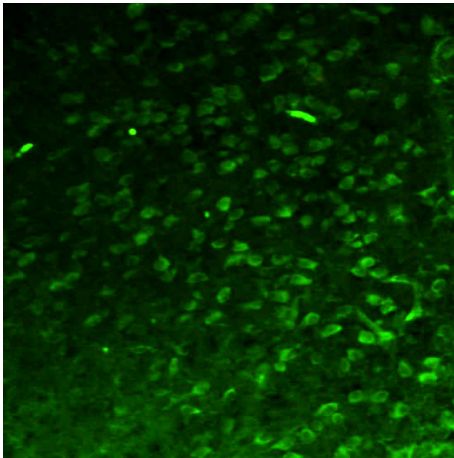


Abb. 18: Anti-JNK 1 in WT, 1:100, 40x, Protokoll 1

Knockout

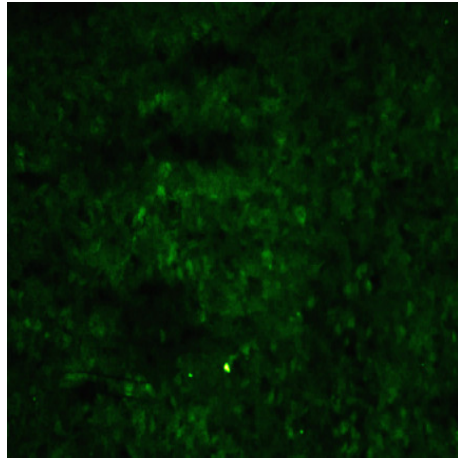


Abb. 19: Anti-JNK 1 in JNK 1 $-/-$, 1:100, 40x, Protokoll 1

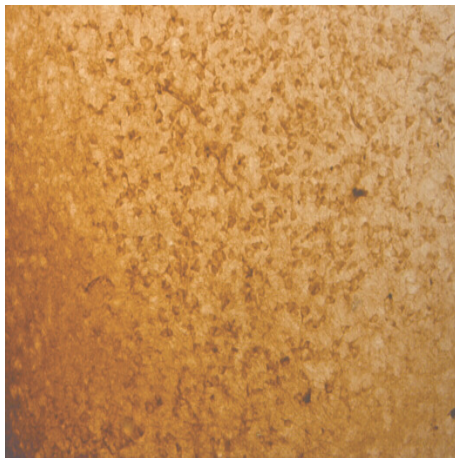


Abb. 20: Anti-JNK 1 in WT, 1:100, 40x, DAB-Protokoll

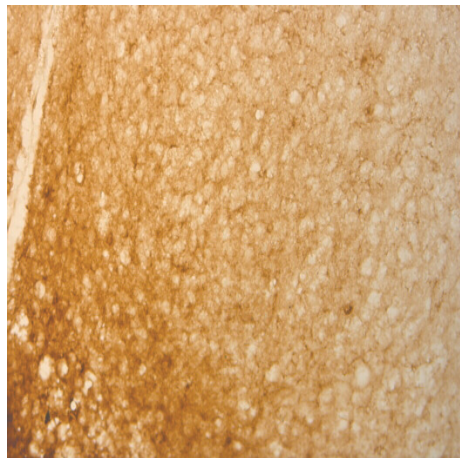


Abb. 21: Anti-JNK 1 in JNK 1 $-/-$, 1:100, 40x, DAB-Protokoll

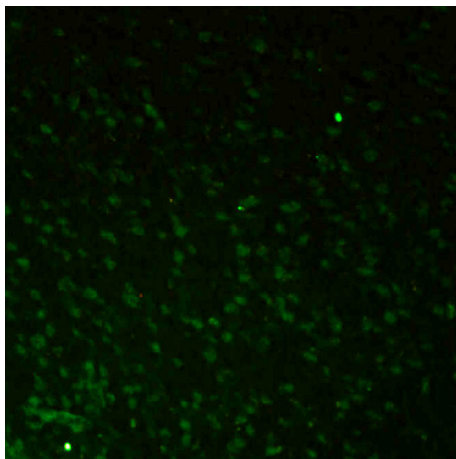


Abb. 22: Anti-JNK 2 in WT, 1:100, 40x, Protokoll 1

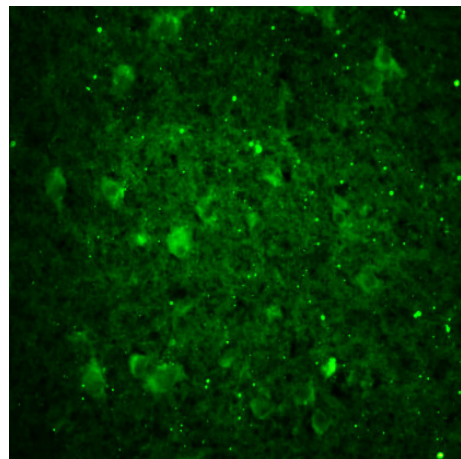


Abb. 23: Anti-JNK 2 in JNK 2 $-/-$, 1:100, 40x, Protokoll 1

Wildtyp

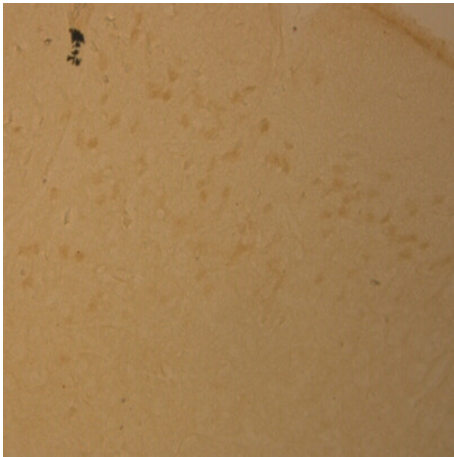


Abb. 24: Anti-JNK 2 in WT,
1:100; 40x, DAB-Protokoll

Knockout



Abb. 25: Anti-JNK 2 in JNK 2 $-/-$,
1:100, 40x, DAB- Protokoll

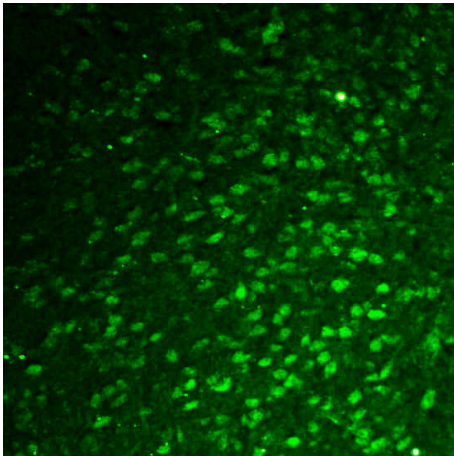


Abb. 26: Anti-JNK 3 in WT,
1:100, 40x, Protokoll 1

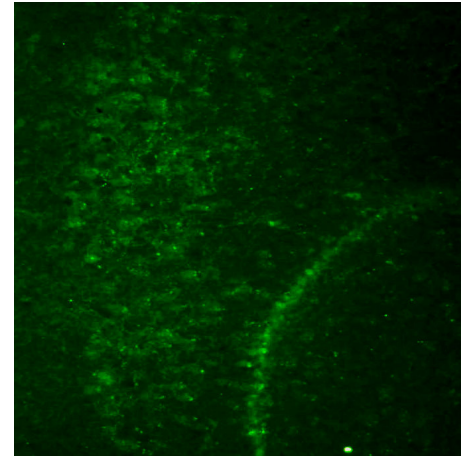


Abb. 27: Anti-JNK 3 in JNK 3 $-/-$,
1:100, 40x, Protokoll 1

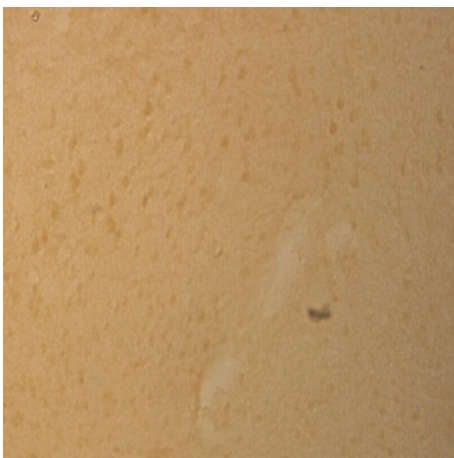


Abb. 28: Anti-JNK 3 in WT,
1:100, 40x, DAB-Protokoll

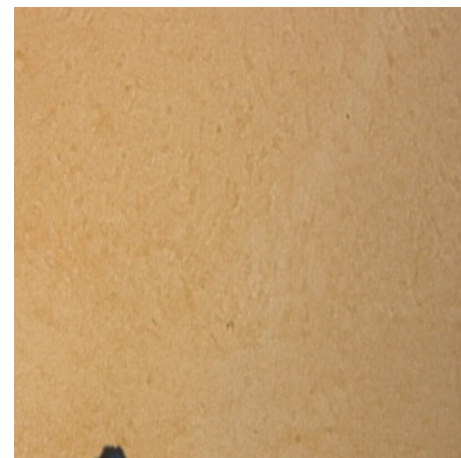


Abb. 29: Anti-JNK3 in JNK 3 $-/-$,
1:100, 40x, DAB-Protokoll

3.5 Anwendung verschiedener Antikörper gegen JNK-Isoformen im Rattenhirn

3.5.1 Gesamt-JNK-Immunreaktivität

Wie schon in Absatz 3.3.1 beschrieben, werden mit dem Gesamt-JNK Antikörper alle 3 Isoformen JNK 1, JNK 2 und JNK 3 angefärbt. Man erkennt auch hier bei der *in vivo* Färbung in Abb. 30 eine deutliche cytoplasmatische Färbung. Bei der gemeinsamen Färbung mit DAPI wird zudem auch ein nukleäres Signal deutlich.

3.5.2 JNK 1-Immunreaktivität

Die JNK 1-Immunreaktivität (Abb. 31) ist im Cytoplasma lokalisiert und setzt sich in die Axone fort. Gleichzeitig ist aber auch ein schwaches nukleäres Signal erkennbar, was in der Doppelfärbung mit DAPI deutlich wird. Durch das hier sehr starke Hintergrundsignal ist die Färbung insgesamt aber schwer zu beuteilen.

Bei der DAB Färbung in Abb. 34 zeigt sich nur ein sehr schwaches Signal.

3.5.3 JNK 2-Immunreaktivität

Die Abb. 32 zeigt eine JNK 2 Färbung. Man sieht einzelne cytoplasmatische Signale, die teils in die Axone fortgehen. Die Zellkerne sind schwächer angefärbt. Leider produziert der Antikörper ein starkes Hintergrundsignal.

3.5.4 JNK 2/3-Immunreaktivität

Sowohl bei der JNK 2/3 Immunfluoreszenzfärbung in Abb. 33, als auch bei der DAB Färbung, zu sehen in Abb. 35, sind die Signale bei starkem Hintergrund sehr schwach, wobei man bei der DAB-Färbung ein etwas deutlicheres Signal im Cytoplasma und Zellkern sieht.

3.5.5 JNK 3-Immunreaktivität

Auch die JNK 3-Immunreaktivität zeigt sich ein relativ starkes Hintergrundsignal (Abb. 36). Gleichzeitig erkennt man ein cytoplasmatisches, teilweise in den Beginn der Axone reichend, und ein deutlich nukleäres Signal.

Abb. 30- 36: Verschiedene JNK-Antikörper im Rattencortex

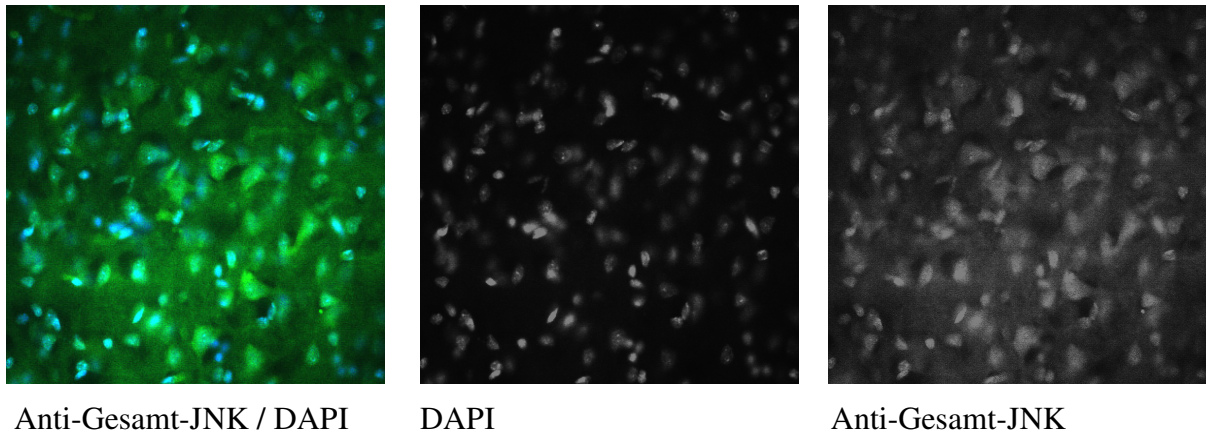


Abb. 30: *In vivo* anti-Gesamt-JNK Färbung am Rattenhirnschnitt (1:50; grün), DAPI (blau), 40x, Protokoll 1

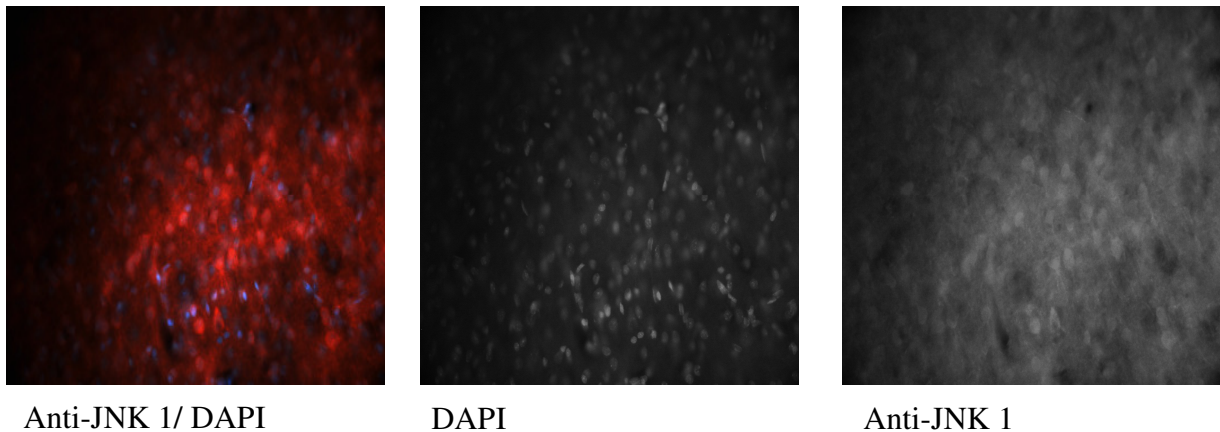


Abb. 31: *In vivo* anti-JNK 1 Färbung am Rattenhirnschnitt (1:100; rot), DAPI (blau), 40x, Protokoll 1

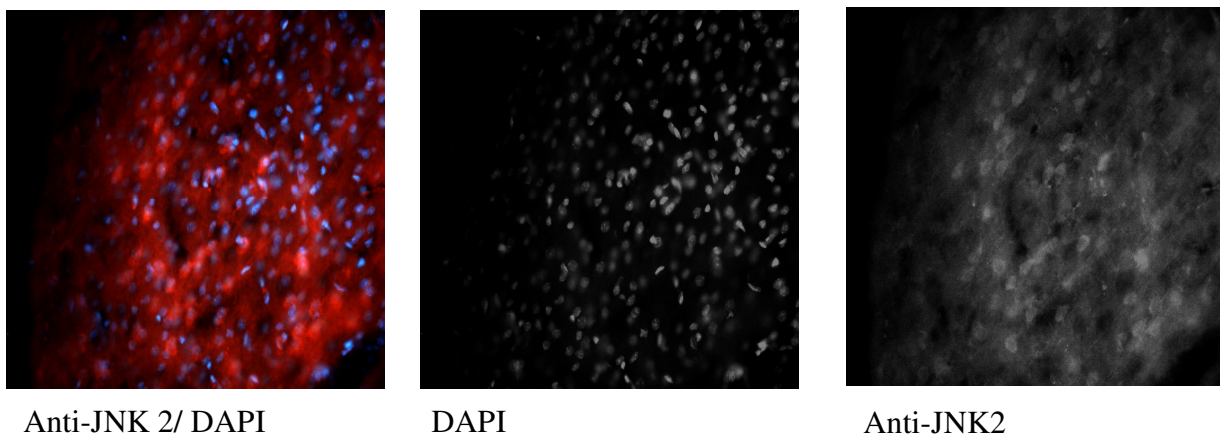
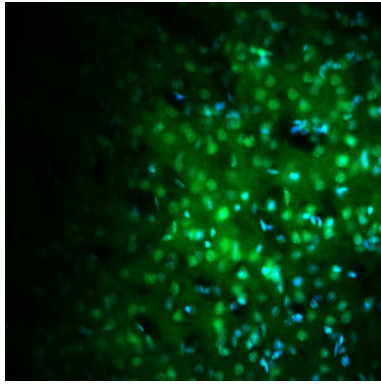
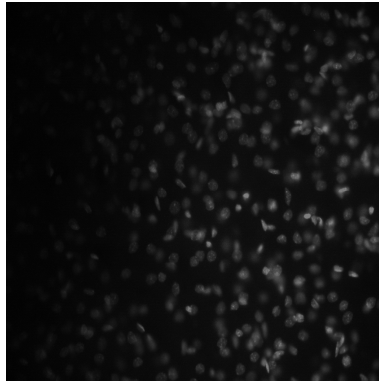


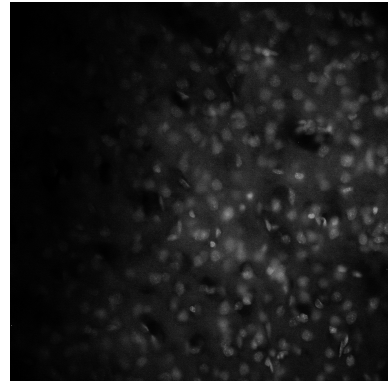
Abb. 32: *In vivo* anti-JNK 2 Färbung am Rattenhirnschnitt (1:50; rot), DAPI (blau), 40x, Protokoll 1



Anti-JNK 2/3/ DAPI



DAPI



Anti-JNK 2/3

Abb. 33: *In vivo* anti-JNK 2/3 Färbung am Rattenhirnschnitt (1:200; grün), DAPI (blau), 40x, Protokoll 1

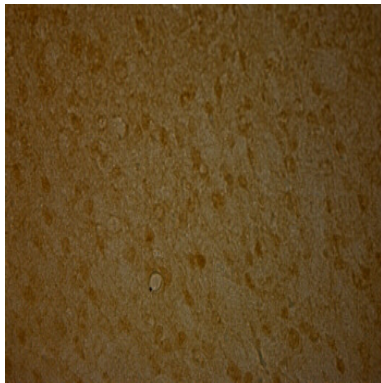


Abb. 34: *In vivo* anti-JNK 1 Färbung am Rattenhirnschnitt (1:100, 40x, DAB-Protokoll)

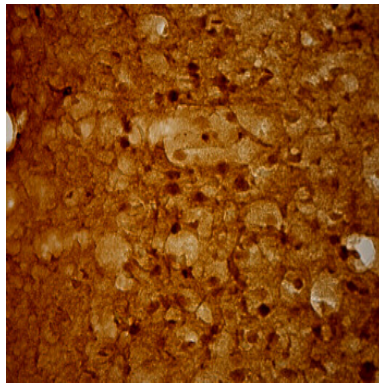


Abb. 35: *In vivo* anti-JNK 2/3 Färbung am Rattenhirnschnitt (1:600, 40x, DAB-Protokoll)

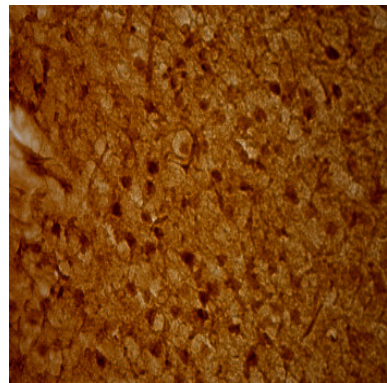


Abb. 36: *In vivo* anti-JNK 3 Färbung am Rattenhirnschnitt (1:600, 40x, DAB-Protokoll)

3.6 Translokation von JNK 2/3-Immunreaktivität nach Schlaganfall

Diese Färbungen wurden nach Protokoll 1 hergestellt. Man erkennt auf der kontralateralen, intakten Seite (Abb. 37) eine eher cytoplasmatische Färbung, die Nuklei sind weniger stark angefärbt. Ipsilateral auf der betroffenen Seite (Abb. 38) zeigt sich ein verstärktes Signal in den Nuklei, d.h. es könnte nach MCAO eine Translokation in den Zellkern stattgefunden haben

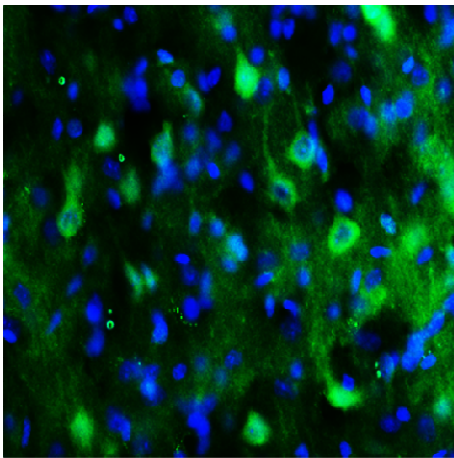


Abb. 37: *In vivo* anti-JNK 2/3 Färbung am Rattenhirnschnitt nach MCAO (1:50; grün), DAPI (blau), 40x, Protokoll 1

Kontralaterale Seite: JNK 2/3-IR im Cytoplasma

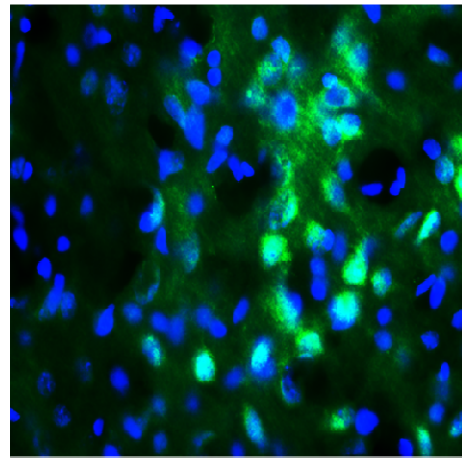


Abb. 38: *In vivo* anti-JNK 2/3 Färbung am Rattenhirnschnitt nach MCAO (1:50; grün), DAPI (blau), 40x, Protokoll 1

Betroffene Seite: JNK 2/3- IR vermehrt im Nukleus

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse der JNK-Isoformen unter basalen Bedingungen

	Cytoplasma	Nukleus	Axone	Hintergrund
JNK 1 Primärkultur	+++	+	+++	-
JNK 1 Gehirn	+++	++	+++	++
JNK 2 Primärkultur	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
JNK 2 Gehirn	+++	+	++	++
JNK 2/3 Primärkultur	+++	++	+++	-
JNK 2/3 Gehirn	++	+++	+	++
JNK 3 Primärkultur	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
JNK 3 Gehirn	++	+++	+	++
Gesamt-JNK Primärkultur	+++	++	+++	-
Gesamt-JNK Gehirn	+++	++	+	++
phospho-JNK Primärkultur	+	+	+++	-
phospho-JNK Gehirn	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Semiquantitative Beschreibung der Immunreaktivitäten: - kein Signal, + mäßiges Signal, ++ starkes Signal, +++ sehr starkes Signal, n.b. nicht bestimmt

Die Immunreaktivität für JNK 1 befindet sich unter basalen Bedingungen, wie sie in diesen Versuchen vorlagen, hauptsächlich im cytoplasmatischen Zellkompartiment und in den Axonen. Während der Zellkern bei der *in vivo* Färbung ein starkes Signal gibt, ist die Intensität in der Primärkultur in diesem Kompartiment nur gering. Ein Problem, welches sich bei allen *in vivo* Färbungen widerspiegelt, ist die starke Hintergrundfärbung. Dieses deutet auf unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper hin.

JNK 2 zeigt im Gewebe eine ähnliche Verteilung wie JNK 1, ist dabei aber etwas geringer in den Axonen lokalisiert.

Vergleicht man die Ergebnisse des anti-JNK 2/3-Antikörpers, ein Antikörper mit geringerer Isoformspezifität, da er sowohl an JNK 2 als auch an JNK 3 bindet, zeigen sich Unterschiede

zwischen der Primärkultur und den *in vivo* Färbungen. In den primären kortikalen Neuronen ist die Immunreaktivität von JNK 2/3 im Cytoplasma und in den Axonen stärker als im Nukleus. Im Gewebe dagegen befindet sich die JNK 2/3-Immunreaktivität am stärksten im nukleären Zellkompartiment, weniger im Cytoplasma und in noch geringerer Intensität in den Axonen.

JNK 3 zeigt *in vivo* ein nahezu gleiches Verteilungsmuster wie JNK 2/3, d.h. die Immunreaktivität ist primär im Nukleus lokalisiert, daneben aber auch in geringerem Maße im Cytoplasma und in den Axonen.

Für Gesamt-JNK ergibt sich die deutlichste Immunreaktivität im Cytoplasma und nahezu ebenso intensiv in den Zellkernen. Während die Gesamt-JNK-IR in der Primärkultur zudem auch deutlich in den Axonen lokalisiert ist, ist dies im Gewebe nur sehr schwach darzustellen. Anti-phospho-JNK zeigt eine basale Aktivität im Cytoplasma, in den Axonen und am stärksten im Zellkern.

Zusammenfassend ergibt sich also bei der Betrachtung der Primärkultur und den *in vivo* Färbungen auch in diesen Ergebnissen teilweise ein widersprüchliches Verteilungsmuster der JNK-Isoformen. Ein großes Problem ist das bei den *in vivo*-Versuchen immer auftretende starke Hintergrundsignal.

Während JNK 1 und JNK 2/3 in der Primärkultur klare, spezifische Verteilungsmuster geben, bei denen eine intrazelluläre Zuordnung der IR möglich ist, ist dies im Gewebe nicht der Fall. Sowohl bei JNK 1 als auch bei JNK 2/3 zeigt sich *in vivo* durch störende Hintergrundsignale keine eindeutige Verteilung der Immunreaktivitäten. Zudem sind dabei auch zwischen Primärkultur und Gewebe, wie schon erwähnt widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich des intrazellulären Verteilungsmusters zu erkennen.

Vergleicht man die *in vivo*-Immunreaktivitäten von JNK 2 und JNK 3 einzeln und dann in der JNK 2/3 Färbung, ergibt sich ein übereinstimmendes Bild für JNK 2/3 und JNK 3, nicht jedoch für JNK 2/3 und JNK 2. Dies deutet auf eine ungenügende Spezifität der Antikörper hin.

Ein ebenfalls inkonsistentes Muster ergibt sich beim Vergleich der Ergebnisse der Gesamt-JNK und JNK 2/3 Immunreaktivitäten *in vivo*. Während die Gesamt-JNK-IR am stärksten im cytoplasmatischen Kompartiment zu finden ist, ist dies bei JNK 2/3 am stärksten im nukleären. Da die JNK 2/3-Immunreaktivität jedoch ein Teil der Gesamt-JNK-IR ist, müßte das Signal von Gesamt-JNK im Zellkern zumindest ebenso stark sein wie das von JNK 2/3.

Auch mit diesem Resultat zeigt sich erneut, dass die Antikörper im Rahmen der *in vivo* Färbungen ungenügende Spezifität besitzen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Untersuchungen zur Darstellung von spezifischen JNK-Verteilungen an primären cortikalen Rattenneuronen und *in vivo* an Ratten- und Mäusehirnen durchgeführt. Zunächst wurden zum einen jeweils Antikörper verwendet, die spezifisch die einzelnen Zellkompartimente sichtbar machen. Zum anderen wurden daraufhin die intrazelluläre Lokalisation und Veränderungen der JNK-Isoformen nach Stimulation untersucht.

4.1 Lokalisation von ATF-2 und c-Jun als Marker für das nukleäre Kompartiment

Um die Verteilung der JNK-Isoformen sicher beschreiben zu können, wurden zunächst die einzelnen Zellkompartimente lokalisiert. Daher wurden bestimmte Antikörper verwendet, die spezifisch für cytoplasmatische, nukleäre, mitochondriale und axonale Färbungen stehen sollten. ATF-2, eine Komponente des AP-1 Transkriptionsfaktorkomplexes, zeigt eine typische nukleäre Färbung. Dieses zeigt sich sowohl bei den *in vitro* als auch bei den *in vivo* Färbungen.

Tabelle 4: Bisherige Veröffentlichungen immunhistochemischer Färbungen mit ATF-2

Neuronale Struktur	Stimulus	Antikörper	1. Basal Stimulation		2. nach	Referenz
			Cytoplasma	Nukleus		
Kortikale Neurone (in vivo)	Ischämie	p-ATF-2 (Cell Signaling 1:100)	1. 0 2. 0	1. ++ 2. ++		Ferrer et al. 2003
N. Vagus/ N. Hypoglossus (in vivo)	Axotomie	ATF-2 (Santa Cruz 1:500)	1. 0 2. 0	1. ++ 2. +		Shimokawara et al. 2002
Retinaganglienzellen/Substantia nigra/ N. Vagus (in vivo)	Axotomie	ATF-2 (UBI, U.S.A., monoklonal, 1:3000)	1. 0 2. 0	1. +++ 2. +		Herdegen et al. 1997

Semiquantitative Beschreibung der Veränderungen: 0 kein Signal, + mäßiges Signal, ++ starkes Signal, +++ sehr starkes Signal

Tabelle 4 zeigt Ergebnisse aus der Literatur. Sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Stimulus zeigt ATF-2 dabei eindeutig nukleäre Signale. Bei Ischämie bleibt die ATF-2

Immunreaktivität im Zellkern nahezu unverändert (Ferrer et al. 2003), nach Axotomie kommt es zu einer Down-Regulation in den Zellen (Shimokawara et al., 2002, Herdegen et al. 1997).

Die ATF-2 Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit denen der bisherigen Veröffentlichungen überein. Mit Sicherheit kann man sagen, dass ATF-2 unter basalen Bedingungen im Bereich des Cortex ein nukleäres Färbemuster ergibt.

c-Jun, genau wie ATF-2, ist eine Komponente des AP-1 (activator protein 1) Transkriptionsfaktorkomplex und wird durch Phosphorylierung an den Serinresten 73 und 63 seines Aminoterminus aktiviert.

Tabelle 5: Beispiele für Veröffentlichungen immunhistochemischer Färbungen mit c-Jun

Neuronale Struktur	Stimulus	Antikörper	1. Basal	2. nach	Referenz
			Stimulation		
			Cytoplasma	Nukleus	
Rückenmarksneurone/ Hinterwurzelganglienzellen	Basal	c-Jun (Kovary/Bravo, 1:10,000)	1. 0	1. ++	Herdegen et al., 1991
Motoneurone	Axotomie	c-Jun (R. Bravo EMBL Heidelberg, 1:4000- 1:15000)	1. 0 2. 0	1. + 2. ++	Leah et al. 1991

Semiquantitative Beschreibung der Veränderungen: 0 kein Signal, + mäßiges Signal, ++ starkes Signal

Herdegen et al. 1991 zeigt eine eindeutige c-Jun-Immunreaktivität im Zellkern, hier untersucht an Rückenmarksneuronen und Hinterwurzelganglienzellen. Bei Versuchen nach Axotomie lässt sich ein Anstieg der c-Jun Immunreaktivität im Zellkern nachweisen. Es ist zudem stets eine basale Aktivität vorhanden (Leah et al. 1991).

In dieser Arbeit sind die Färbungen unter basalen Bedingungen durchgeführt worden und lassen eindeutige nukleäre Signale erkennen. Das spezifische Zellkompartiment für c-Jun ist basal und nach Stimulation somit eindeutig nukleär.

4.2 Lokalisation von ATF-3 als Marker für das cytoplasmatische Kompartiment

Die ATF-3 Färbung lässt unter Basalbedingungen eindeutig eine cytoplasmatische Färbung erkennen (Abb. 3). In der reinen ATF-3 Färbung ohne DAPI sieht man einen vollständig ausgesparten Nukleus, obwohl auch ATF-3 zum AP-1 Transkriptionsfaktorkomplex gehört.

Tabelle 6: Bisherige Veröffentlichungen immunhistochemischer Färbungen mit ATF-3

Neuronale Struktur	Stimulus	Antikörper	1. Basal	2. nach	Referenz
			Stimulation		
			Cytoplasma	Nukleus	
Kortikale Neurone (<i>in vivo</i>)	MCAO	ATF-3 (Santa Cruz 1:1000, polyklonal)	1. n.d. 2. 0	1. n.d. 2. +	Ohba et al. 2003
Oberes Zervikalganglion (<i>in vivo</i>)	JNK-Inhibitor SP600125	ATF-3 (Santa Cruz 1:200, polyklonal)	1. 0 2. 0	1. + 2. +	Lindwall et al. 2005
Nervus Ischiadicus (<i>in vivo</i>)	Axotomie	ATF-3 (Santa Cruz)	1. n.d. 2. ++	1. n.d. 2. +	Lindwall et al. 2005
Motoneurone (<i>in vitro</i>)	Amyotrophe Lateralsklerose	ATF-3 (Santa Cruz, 1:1000)	1. n.d. 2. ++	1. n.d. 2. ++	Vlug et al. 2005

Semiquantitative Beschreibung der Veränderungen: 0 kein Signal, + mäßiges Signal, ++ starkes Signal, n.d. nicht dargestellt

Nach MCAO kommt es zu einer Induktion von ATF-3 in den Zellkernen (Ohba et al. 2003); in den Kontrollen zeigt sich keine ATF-3 Expression, dieses wird mittels Westernblot nachgewiesen.

Die ATF-3 Immunreaktivität steht im Zusammenhang mit der JNK-Aktivierung. Dies erkennt man an der reduzierten Intensität der ATF-3 IR und der geringeren Anzahl der ATF-3 positiven Zellen unter Einfluss des JNK Inhibitors SP600125 (Lindwall et al. 2005). Vor und nach Stimulation zeigt sich dabei ein eher nukleäres Signal, das nach Stimulation an Anzahl und Intensität abnimmt.

Bei Versuchen an axotomierten Nervi ischiadici zeigt sich eine eher axoplasmatische Lokalisation des Signals, weniger dagegen im Nukleus (Lindwall et al. 2005). Es fehlt hierbei allerdings die Darstellung unter basalen Bedingungen. Bei Vlug et al. 2005 zeigt sich ein cytoplasmatisches und nukleäres Muster. Auch hier gibt es keine Darstellungen unter Basalbedingungen. Zusammenfassend ist zu sagen, dass in den genannten Veröffentlichungen teilweise gar keine genaue Differenzierung zwischen cytoplasmatisch und nukleär erfolgt. Außerdem ist auffällig, dass es fast ausschließlich Darstellungen unter Stimulus-Einfluss sind, die basale intrazelluläre Verteilung wird dabei nicht nachgewiesen.

Obwohl ATF-3 zu den Transkriptionsfaktoren gehört, die ihre Wirkung im Zellkern entfalten, ist in dieser Arbeit ein eindeutiges cytoplasmatisches Signal basal vorhanden, was die

Vermutung nahelegt, dass ATF-3 erst nach Stimulus-Einfluss im Zellkern lokalisiert ist. Es gibt jedoch weder entsprechend unterstützende noch eindeutig widerlegende Referenzen. Als ein Substrat von JNK sollte ATF-3 hier als Marker für Translokationen verwendet werden.

4.3 Lokalisation von TOM20 und GRP 75 als mitochondrialer Marker

TOM20 ist ein mitochondrialer Marker. Der TOM-Komplex (translocase of the outer membrane) ist eine Proteintranslokase, die sich an der Aussenmembran der Mitochondrien befindet und für den Transport von Proteinen zuständig ist.

Die Färbung ergibt einen mitochondrialen Verteilungstyp. Während der Nukleus nicht angefärbt ist, erkennt man im Cytoplasma und in den Neuriten dünne, längliche Strukturen. Diese stellen die Akkumulierung von Mitochondrien dar.

Tabelle 7: Immunhistochemische Darstellung von TOM20

Zelluläre Struktur	Antikörper	Lokalisation	Referenz
COS-7 Zellen	TOM20- GFP	Mitochondrien perinukleär	Kanaji et al. 2000

Diese Veröffentlichung zeigt ein mitochondriales Verteilungsmuster mit perinukleären Signalen im Cytoplasma, der Zellkern ist dabei vollständig ohne Immunreaktivität.

Dieses unterstützt die Ergebnisse dieser Arbeit, in der ebenfalls mitochondriale Signale im Cytoplasma und hier auch in den Axonen zu erkennen sind. Da es in den einschlägigen Referenzen keine Veröffentlichung mit anti-TOM20 Färbungen im Gehirn oder an Kultur neuronaler Zellen gibt, müssen diese Zellen zum Vergleich herangezogen werden.

Tabelle 8: Immunhistochemische Darstellung von GRP 75

Zelluläre Struktur	Antikörper	Lokalisation	Referenz
3T3 (Fibroblasten in vitro)	mot-2-GFP (grün fluoreszierendes Protein an Mortlin2/ GRP 75)	Cytoplasma	Wadhwa et al. 2002
Differenzierte und undifferenzierte Neuroblastomzellen	GRP 75 (Santa Cruz, 1:100)	Cytoplasma	Hsu et al. 2008
REF-52	GRP 75 (1:100)	Cytoplasma	Mizzen et al. 1989

GRP 75 befindet sich in der mitochondrialen Matrix. Bei der *in vivo* GRP 75 Färbung zeigt sich nicht so ein deutliches mitochondriales Muster in Form von länglichen Strukturen wie bei der Primärkultur mit TOM20. Stattdessen kann eine weniger differenzierte cytoplasmatische Färbung mit axonaler Beteiligung nachgewiesen werden.

Auch in diesen Referenzen sind keine Nachweise an neuronalen Zellen oder im Gewebe durchgeführt worden. Die intrazelluläre Verteilung stimmt dabei aber eindeutig mit der aus dieser Arbeit überein. GRP 75 als mitochondrialer Marker ergibt immer ein Signalmuster, welches sich im Cytoplasma und in den Axonen, den Lokalisationsorten der Mitochondrien, befindet.

4.4. Lokalisation von MAP-2 als axonaler Marker

MAP-2 (microtubule associated protein 2) ist ein neuronales Marker-Phosphoprotein, das die Stabilität von Mikrotubuli, die neuronale Morphogenese und die cytoskelettale Dynamik in Axonen und Dendriten reguliert. Auch MAP-2 ist ein Substrat von JNK.

Tabelle 9: Beispiele für Veröffentlichungen immunhistochemischer Färbungen mit MAP-2

Neuronale Struktur	Antikörper	Lokalisation	Referenz
Primärkultur cortikaler Neurone	MAP-2 (Sigma, 1:500, monoklonal)	Zellkörper/Fortsätze (Neuriten)	Figuera-Masot et al. 2001
Subcortikale Neurone (human) (<i>in vivo</i>)	MAP-2 (Sigma)	Zellkörper/ Försätze (Axon/Dendriten) (parallel)	Chang et al. 2008

In beiden Veröffentlichungen sieht man ein typisches MAP-2 Signal, das sowohl die Zellkörper als auch die Axone und Dendriten anfärbt. Die parallele Ausrichtung der Denriten in den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt sich ebenso eindeutig in der Veröffentlichung von Chang et al. 2008.

4.5 Immunhistochemische Verteilung der JNK-Isoformen *in vitro*

Vergleicht man die Färbungen an Primärkultur mit den *in vivo* Darstellungen, ist die Qualität an der Primärkultur besser. Die Zellen sind einzeln darstellbar und somit deren Immunreaktivität genauer zu differenzieren. Dies könnte eine Ursache der Unterschiede sein. Da unspezifische Bindungen durch umliegendes Gewebe entfallen, gibt es nahezu keine

Hintergrundfärbung. Sowohl an der Primärkultur als auch am Gewebe wurden Färbungen mit bis zu 2 verschiedenen Antikörpern und DAPI-Signal durchgeführt, was der maximal möglichen Zahl von Farbkanälen des eingesetzten Mikroskops entspricht. Es wurde dabei auf die Verwendung neuronaler Marker verzichtet, da es in diesen Versuchen weniger auf den Zelltyp als auf das intrazelluläre Verteilungsmuster der JNKs ankommt.

Aus den Vergleichen mit den Zellkompartiment-spezifischen Antikörpern geht hervor, dass JNK 1 unter basalen Bedingungen das typische Bild eines cytoplasmatischen Signals mit geringem Anteil im Nukleus ergibt. JNK 2/3 dagegen zeigt neben der cytoplasmatischen Färbung ein ebenfalls deutliches Signal im Nukleus. Das Gesamt-JNK zeigt ein ähnliches Bild wie JNK 2/3.

Phospho-JNK ist unter Basalbedingungen hauptsächlich im Nukleus lokalisiert, nur wenig im Cytoplasma und in Neuriten.

Tabelle 10: Bisherige Veröffentlichungen immunhistochemischer Färbungen der JNK-Isoformen und phospho-JNK in Kulturen von primären cortikalen Neuronen

Stimulus	Antikörper	1. Basal	2. nach Stimulation		Referenz
		Cytoplasma	Nukleus	Fortsätze	
Glutamat	JNK1/2 (Promega, 1:200) phospho-JNK (Promega, 1:100)	1. +++ 2. ++	1. + 2. +++	n.d.	Jiang et al. 2002
		1. + 2. ++	1. + 2. +++	n.d.	
HNE (4-hydroxy-2,3-nonenal)	phospho-JNK (Santa Cruz 1:300, monoklonal)	1. + 2. ++	1. n.d. 2. +++	n.d.	Camandola et al. 1999
Taxol	phospho-JNK (New England Biolabs, polyklonal, 20 ng/ml)	1. ++ 2. +	1. 0 2. ++	1. ++ 2. +	Figuera-Masot et al. 2001
Anisomycin H ₂ O ₂	phospho-JNK (Santa Cruz, monoklonal)	1. + 2. ++ (Mitochondrien)	1. + 2. ++	n.d.	Zhou et al. 2007
Okadainsäure	phospho-JNK (Cell Signaling Technologies, monoklonal)	1. + 2. +++	n.d.	1. + 2. +++	Yoon et al. 2005
Entzug von Wachstumsfaktoren (Cerebelläre Neurone)	JNK 1 (PharMingen, monoklonal, 0,5 µg/ml)	1. ++ 2. n.d.	1. 0 2. n.d.	n.d.	Coffey et al. 2002
	JNK 2/3 (Upstate, polyklonal, 0,2 µg/ml)	1. + 2. n.d.	1. ++ 2. n.d.	n.d.	

Semiquantitative Beschreibung der Veränderungen: 0 kein Signal, + mäßiges Signal, ++ starkes Signal, +++ sehr starkes Signal, n.d. nicht dargestellt

Die oben aufgeführte Tabelle stellt die bisherigen Ergebnisse aus der Literatur zusammen. In den Arbeiten wurden immunhistochemische Färbungen an primären cortikalen Neuronen durchgeführt, wobei der Einfluss verschiedener Stressstimuli betrachtet werden sollte. Es wurde dabei hauptsächlich die Lokalisation und Translokation von phospho-JNK beschrieben,

weniger von den JNK-Isoformen. Zusammenfassend unterstreichen die Resultate das bisherige Wissen über Vorkommen und Funktion von phospho-JNK. Phospho-JNK ist die unspezifische phosphorylierte Form der JNK-Isoformen. Sie befindet sich basal sowohl im Cytoplasma als auch in den Fortsätzen und den Zellkernen. Bei entsprechender Stimulation kommt es zu einer Hochregulation von phospho-JNK im Zellkern, was schließlich zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-Jun oder ATF-2 führt.

Wie aus der Tabelle ersichtlich gibt es bisher nur eine geringe Anzahl an Veröffentlichungen über JNK-Isoformen an Primärkulturen. Hauptsächlich wurde die phosphorylierte Form untersucht und dabei versucht, Veränderungen des Signals unter Stressstimuli darzustellen.

In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt sich unter basalen Bedingungen eine deutliche Signalanreicherung für phospho-JNK im Nukleus, eine nur geringe Immunreaktivität dagegen im Cytoplasma und in den Fortsätzen.

Aus der Doppelfärbung phospho-JNK und JNK 1 (Abb. 16) läßt sich aufgrund einer geringen nukleären Kolokalisation der beiden Antikörper schließen, dass JNK 1 nicht der Hauptträger des phosphorylierten JNK sein kann. Besonders in der vergrößerten Darstellung in Abb. 17 ist eine deutliche Kompartimentverteilung erkennbar. Während JNK 1 im cytoplasmatischen Zellkompartiment lokalisiert ist, zeigt sich für JNK 2/3 neben der cytoplasmatischen eine granuliert Immunreaktivität im Zellkern. Die phospho-JNK-Immunreaktivität befindet sich vermehrt im Zellkern und zeigt dabei ebenso granuliert Signalanreicherungen wie in der JNK 2/3 Abbildung. Eine Kolokalisation von JNK 2/3 und phospho-JNK im Zellkern liegt also nahe. Fraglich bleibt jedoch der offensichtliche Signal-Intensitätsunterschied zwischen phospho-JNK und JNK2/3. Es deutet möglicherweise auf unspezifische Bindungen des phospho-JNK-Antikörpers hin.

Generell läßt sich dieses Ergebnis wiederum nicht klar mit der bisherigen Literatur bestätigen. Welche der JNK- Isoformen geht nun aber in die phosphorylierte Form im Zellkern über, und welche Isoform tritt im Cytoplasma in phosphorylierter Form auf?

In der Literatur wird dieses u.a. in Versuchen an cerebellären Neuronen beschrieben (Coffey et al. 2002). Trotz der hohen basalen Aktivität ist JNK 1 nicht die Isoform, die unter Stressstimuli letztendlich eine Phosphorylierung von c-Jun bewirkt, sondern JNK 2/3. Hinweis dafür könnte alleine schon die Lokalisation der Isoformen in der Zelle sein. Bei den immunhistochemischen Färbungen zeigt sich ein cytoplasmatisches Signal von JNK 1. JNK 2/3 ist genau wie c-Jun vermehrt im Nukleus lokalisiert, was zu der selektiven Aktivierung von c-Jun durch JNK 2/3 führen könnte. Eine weitere Veröffentlichung (Brecht et al. 2005) zeigte an Westernblot-Untersuchungen, aber nicht an immunhistochemischen Färbungen, dass

JNK 1 unter Basalbedingungen die JNK-Isoform ist, die den Hauptträger des phosphorylierten JNK ausmacht. Hierbei muß jedoch noch genauer zwischen den einzelnen Hirnregionen unterschieden werden. Im Bereich des Cortex trifft die obige Beschreibung zu. Im Cerebellum und im Striatum trägt JNK 3 maßgeblich zur Menge des phosphorylierten JNK bei, da im JNK 3-Knockout der Anteil des phospho-JNK vermindert ist. JNK 3 macht also in diesen Arealen den Hauptträger des phosphorylierten JNK aus.

Welche Isoform der Hauptvertreter des phosphorylierten JNKs ist, ist also noch nicht eindeutig geklärt.

Eine genaue Differenzierung zwischen basaler und stressinduzierter Aktivität der JNKs ist wichtig. Des weiteren müssen die verschiedenen Hirnareale einzeln behandelt werden, da es je nach Bereich unterschiedliche Aktivitätsmuster zu geben scheint.

Bezüglich der Methoden zur Ergebnisherstellung steht in der Literatur noch immer die Westernblot-Methode im Vordergrund, mit deren Hilfe auch in den genannten Veröffentlichungen gearbeitet wurde.

Die Einordnung in die aktuelle Literatur bleibt schwierig, zum einen aufgrund der teilweise unterschiedlichen Methoden, die angewendet wurden. Die Verteilungen im Westernblot können nicht ohne weiteres mit Immunfluoreszenz-Färbungen verglichen werden. Während im Westernblot alle Zelltypen des untersuchten Gewebes in die Ergebnisse miteinbezogen werden, wird bei der Immunfluoreszenz-Methode die Immunreaktivität der verwendeten Antikörper nur in den Neuronen dargestellt.

Zum anderen bleibt die Einordnung aufgrund des unterschiedlichen Gewebes, das angefärbt wurde, schwierig. Können Maus- und Rattengewebe ohne weiteres nebeneinander dargestellt werden? In den erwähnten Veröffentlichungen von Coffey et al. 2002 wurden cerebelläre Neurone aus der Ratte für die Versuche verwendet, bei Brecht et al. 2005 wurden die Versuche an KO-Mäusen durchgeführt.

4.6 Immunhistochemische Darstellung der JNK-Isoformen im Gehirn von adultem Wildtyp- und Knockout-Gewebe

Bei den Knockout-Mäusen werden mittels genetischer Manipulation gezielt ein oder mehrere Gene deaktiviert. In diesem Fall werden JNK 1, 2 und 3 Knockout-Tiere (KO/-/-) verwendet, d.h. Tiere, bei denen jeweils eines dieser Gene deletiert wurde (Übersicht Waetzig und Herdegen 2005). Dadurch ist es möglich, die Spezifität der verwendeten Antikörper genau zu

prüfen, da z.B. im JNK 1 -/- der JNK 1 Antikörper kein Signal geben sollte. Entsprechend gilt dies auch für die anderen Isoformen.

Tabelle 11: Veröffentlichungen immunhistochemischer JNK-Isoform-Färbungen an Wildtyp-Mäusen

Neuronale Struktur	Antikörper						Referenz
	JNK 1 (PharMingen, 1:200, monoklonal,		JNK 2 (Upstate Biotechnologie, 1:1000/ 1:1500, polyklonal)		JNK 3 (Upstate Biotechnologie, 1:1000/ 1:1500, polyklonal)		Lee et al. 1999
	Cyto.	Nukl.	Cyto.	Nukl.	Cyto.	Nukl.	
Cortex	++	+	+	+	+	++	
Cerebelläre Purkinje Zellen	++	+	n.d.	n.d.	+	++	
	Dendriten ++						

Semiquantitative Beschreibung der Veränderungen: 0 kein Signal, + mäßiges Signal, ++ starkes Signal
n.d. nicht dargestellt

Lee et al. 1999 beschreibt die intrazelluläre Verteilung der JNK-Isoformen an Mausgewebe. Obwohl alle 3 Isoformen im Cytoplasma und den Nuklei verteilt sind, gibt es Unterschiede in der Konzentration in den jeweiligen Zellkompartimenten. Während JNK 2 nahezu gleichmäßig im Cytoplasma und im Kern verteilt ist, zeigt sich bei JNK 3 in den beschriebenen Hirnregionen eine eindeutig vermehrt nukleäre Lokalisation. Bei JNK 1 dagegen ist eine stärkere Anreicherung des Signals im Cytoplasma und in den Dendriten zu erkennen, weniger jedoch in den Nuklei. Die Spezifität der Antikörper weist Lee et al. mit Hilfe der Westernblot-Methode nach, es werden daraufhin jedoch keine immunhistochemischen Nachweise im Knockoutgewebe, sondern nur im Wildtyp gezeigt.

Brecht et al. 2005 beweisen die Spezifität der Antikörper mittels der Westernblot-Methode im Wildtyp und Knockout. Er geht dabei jedoch zunächst weniger auf die intrazelluläre Verteilung der JNK-Isoformen ein, sondern vor allem auf die regionale Verteilung der JNKs im Gehirn. Bei beiden Arbeiten wurde keine immunhistochemische Darstellung der JNK-Isoformen im Knockoutgewebe durchgeführt.

Vergleicht man die Arbeit von Lee et al. 1999 mit den Ergebnissen dieser Arbeit, so stimmt für JNK 1 das cytoplasmatische Verteilungsmuster im Wildtyp überein. Die JNK 3-IR zeigt im Wildtyp in dieser und der angegebenen Referenz eine ähnliche vor allem nukleäre Lokalisation. Bei der JNK 2-IR divergieren die Resultate im Wildtyp. In dieser Arbeit ist die

Hauptlokalisation der Zellkern, während Lee et al. 1999 eine ausgeglichene Verteilung der JNK 2-IR im Cytoplasma und dem Nukleus zeigt.

Färbungen an KO-Gewebe sind bei den angegebenen Referenzen nicht vorhanden. In diesen Ergebnissen lassen sich Signale darstellen, bei denen es sich jedoch wahrscheinlich um unspezifische Immunreaktivitäten handelt.

4.7 Immunhistochemische Verteilung der JNK-Isoformen in der Ratte

Tabelle 12: Veröffentlichungen immunhistochemischer *in vivo* Färbungen der JNK-Isoformen und phospho-JNK in der Ratte

Neuronale Struktur	Stimulus	Antikörper	Lokalisation		Referenz
			1. Basal	2. nach Stimulation	
			Cytoplasma	Nukleus	
Hippocampale Neurone	Morbus Alzheimer	phospho-JNK (New England Biolabs, 1:300, polyklonal)	1. 0 2. 0	1. 0 2. ++	Zhu et al. 2002
Cortikale Neurone/ Striatum	MCAO	phospho-JNK (Cell-Signaling, 1:100, polyklonal)	1. 0 2. 0	1. 0 2. ++	Ferrer et al. 2003
Neuroendokrine Zellen des N. supraopticus	Wasser-deprivation	JNK 2 (Upstate Biotechnology, 1:1,000)	1. + 2. ++	1. 0 2. +	Meeker und Fernandes 2000
		JNK 3 (Upstate Biotechnology, 1:2000)	1. + 2. +	1. + 2. ++	
Dorsale cortikale Neurone	Wasser-deprivation	JNK 2 (Upstate Biotechnology, 1:1000)	1. + 2. +	1. + 2. +	Meeker und Fernandes 2000
		JNK 3 (Upstate Biotechnology, 1:2000)	1. + 2. ++	1. + 2. +++	
Hippocampale Neurone	MCAO	JNK 3 (Upstate Biotechnology, 1:100)	1. + 2. 0	1. 0 2. +++	Zhang et al. 1998

Semiquantitative Beschreibung der Veränderungen: 0 kein Signal, + mäßiges Signal, ++ starkes Signal, +++ sehr starkes Signal

Die Tabelle verdeutlicht die geringe Anzahl immunhistochemischer *in vivo* Färbungen am Rattengewebe. Es geht aber daraus hervor, dass phospho-JNK eindeutig im nukleären Kompartiment vorhanden ist (Zhu et al. 2002, Ferrer et al. 2003). JNK 2 befindet sich in den Ergebnissen dieser Arbeiten hauptsächlich im Cytoplasma der Zellen und eher weniger im Nukleus (Meeker und Fernandes 2000). Bei den JNK 3-Färbungen zeigen sich die Signale vor allem im Nukleus, dieses besonders nach Stimulus-Einfluss (Meeker und Fernandes 2000, Zhang et al. 1998).

Während phospho-JNK in dieser Arbeit bereits neben dem cytoplasmatischen ein eindeutiges nukleäres Signal basal ergibt, tritt dieses bei Zhu et al. 2002 und Ferrer et al. 2003 erst nach Stimulation wie z.B. Ischämie auf. Betrifft dieses bei Zhu et al. 2002 zwar die hippocampalen Neurone, so ist es bei Ferrer et al. 2003 die gleiche Hirnregion wie in diesen Versuchen, so dass man von ähnlichen Ergebnissen ausgehen müsste. Die basale Färbung wird bei Ferrer et al. 2003 als negativ beschrieben.

Bei den Ergebnissen der JNK 2 Färbungen ergibt sich wie in dieser Arbeit ein cytoplasmatisches Signalmuster. Ebenso sind sowohl bei Meeker und Fernandes 2000 als auch in dieser Arbeit nukleäre Signale vorhanden. Fasst man also die Resultate dieser und der veröffentlichten Arbeiten zusammen, scheint die intrazelluläre basale Verteilung von JNK 2 übereinstimmend zum Hauptteil im Cytoplasma und geringer im Zellkern mittels immunhistochemischer Methode nachweisbar.

Wie schon erwähnt zeigt JNK 3 bereits basal eine deutliche Anfärbung des nukleären Zellkompartiments (Meeker und Fernandes 2000), gleichzeitig ist aber auch immer ein cytoplasmatisches Signal vorhanden. Bei Zhang et al. 1998 dagegen tritt das JNK 3 Signal erst nach MCAO in Erscheinung. Basal zeigt sich eine negative Färbung im Bereich der hippocampalen Neurone.

Die Ergebnisse der Veröffentlichungen stimmen insgesamt also nur teilweise mit denen dieser Arbeit überein.

4.8 Translokation von JNK 2/3 nach Schlaganfall

Tabelle 13: Bisherige Veröffentlichungen immunhistochemischer Färbungen von JNK 2/3 mit Translokation nach Stress

Neuronale Struktur	Stimulus	Antikörper	Folge		Referenz
			1. Basal	2. Stimulus	
			Cytoplasma	Nukleus	
Hippocampale Neurone	MCAO	JNK 3 (Upstate Biotechnology, 1:100)	1. + 2. 0	1. 0 2. +++	Zhang et al. 1998

Semiquantitative Beschreibung der Veränderungen: 0 kein Signal, + mäßiges Signal, ++ starkes Signal, +++ sehr starkes Signal

Zhang et al. 1998 zeigt in hippocampalen Neuronen eine eindeutige stressabhängige Translokation von JNK 3 in den Nukleus.

Auch in dieser Arbeit sollten Veränderungen dargestellt werden. Es kann jedoch kein aussagekräftiges Resultat daraus gezogen werden. Man kann bei einigen Neuronen ein vermehrt nukleäres Signal auf der betroffenen Seite feststellen.

Sind einerseits zwar leichte Unterschiede der Färbungen ipsi- und kontralateral nach MCAO zu erkennen, so ist dies kein verlässliches und vor allem nicht reproduzierbares Ergebnis.

5. Zusammenfassung

Die c-Jun N-terminal Kinasen (JNKs) spielen eine wichtige Rolle im zentralen Nervensystem. Sie haben sowohl physiologische Funktionen als auch pathologisch-degenerative Eigenschaften. Entscheidend für das Verständnis dieser unterschiedlichen Wirkungen ist u.a. die intrazelluläre Verteilung der JNK-Isoformen, die mit Hilfe der Immunhistochemie beschrieben werden kann. Entsprechende Befunde sind in bisherigen Veröffentlichungen nur mit ungenügenden Kontrollen und mit widersprüchlichen Ergebnissen publiziert.

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen an primären kortikalen Rattenneuronen und *in vivo* Darstellungen an Ratten- und Mäusehirnen die spezifische Expression der JNK-Isoformen nachzuweisen. Dabei wurden zum einen jeweils Antikörper verwendet, die spezifisch einzelne Zellkompartimente darstellen. Zum anderen sollte daraufhin die genaue Lokalisation und gegebenenfalls Translokation der JNK-Isoformen dargestellt werden.

Das Problem der immunhistochemischen Färbungen liegt in der fraglichen Spezifität der JNK-Antikörper. Während in der Primärkultur die Färbungen mit ATF-2, ATF-3, TOM20 einerseits und den JNK-Isoformen bzw. Gesamt-JNK und phospho-JNK andererseits klar zu beschreiben sind, sind die *in vivo* Färbungen weniger eindeutig und stets mit starkem Hintergrund und unspezifischen Signalen verbunden. Beim Vergleich der Primärkultur und den *in vivo* Färbungen ergeben sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit bereits widersprüchliche Verteilungsmuster der JNK-Isoformen, die jedoch teilweise auf Kulturbedingungen von primären Zellen zurückgeführt werden könnten.

Es zeigt sich für phospho-JNK in der Primärkultur ein stärkeres Signal im Zellkern im Vergleich zur Gesamt-JNK-IR, trotzdem die Menge aus der Gesamt-JNK-IR hervorgeht.

Die JNK 1-Immunreaktivität zeigt an der Primärkultur ein cytoplasmatisches in die Axone fortlaufendes Muster mit geringem Anteil im Zellkern, im Gehirnschnitt sind die Signale sowohl cytoplasmatisch als auch nukleär verteilt. Die JNK 2-IR zeigt ein ähnliches Muster, jedoch geringerem Anteil in den Axonen.

Die JNK 2/3-IR ist in der Primärkultur im Cytoplasma und in den Axonen, weniger dabei im Zellkern lokalisiert, *in vivo* dagegen ist die JNK 2/3-IR am stärksten im Zellkern. Beim Vergleich der *in vivo* Färbungen der selektiven JNK 2 und JNK 3-Antikörper und des JNK 2/3-Antikörpers ergibt sich ein übereinstimmendes Bild für die JNK 2/3-IR und JNK 3-IR, nicht jedoch für JNK 2/3-IR und JNK 2-IR.

Während die Gesamt-JNK-IR am stärksten im cytoplasmatischen Zellkompartiment lokalisiert ist, ist die JNK 2/3-IR, die einen Teil der Gesamt-IR darstellt, am stärksten im Nukleus.

Färbungen an Gehirnschnitten von JNK defizienten Mäusen und ihrer Kontrollen zeigen ebenfalls unspezifische Immunreaktivitäten. Mit den verwendeten Antikörpern lassen sich Immunreaktivitäten sowohl im Wildtyp als auch im Knockout nachweisen, obwohl das entsprechende Antigen im Knockout fehlt.

Veränderungen der Immunreaktivität nach Stress, hier nach cerebraler Ischämie, können für JNK 2/3 gezeigt werden. Es kann dabei eine Translokation in den Zellkern beschrieben werden, die jedoch noch weiter untersucht werden muß, da sie in diesen Versuchen nur mäßig reproduzierbar ist.

So muß abschließend festgestellt werden: Der Nachweis der spezifischen Verteilung von JNK-Isoformen mit Hilfe der Immunhistochemie scheint mit den gegenwärtig verwendeten Antikörpern nicht in der Qualität möglich zu sein, um wirklich immunhistochemische Untersuchungen zur reaktiven Translokation und Kompartimentalisierung von JNK-Isoformen durchzuführen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Der MAP-Kinase-Signalweg.....	2
Abb. 2: ATF-2 in primären cortikalen Neuronen als Beispiel für ein nukleäres Signal (1:600 (grün), DAPI (blau), 63x, Protokoll 1)	19
Abb. 3: ATF-3 in primären cortikalen Neuronen als Beispiel für ein cytoplasmatisches Signal (1:600 (grün), DAPI (blau), 63x; Protokoll 1).....	19
Abb. 4: TOM20 in primären cortikalen Neuronen als Beispiel für ein mitochondriales Signal (1:100 (grün), DAPI (blau), 63x; Protokoll 1).....	19
Abb. 5: <i>In vivo</i> c-Jun Färbung am Rattenhirnschnitt als Beispiel für ein nukleäres Signal, 1:100, 40x, DAB- Protokoll.....	21
Abb. 6: <i>In vivo</i> c-Jun Färbung am Rattenhirnschnitt als Beispiel für ein nukleäres Signal (1:100; 40x; Protokoll 1).....	21
Abb. 7: <i>In vivo</i> ATF-2 Färbung am Rattenhirnschnitt als Beispiel für ein nukleäres Signal, 1:100, 40x, DAB- Protokoll.....	21
Abb. 8: <i>In vivo</i> GRP75Färbung am Rattenhirnschnitt als Beispiel für ein cytoplasmatisches Signal (1:100, 40x, Protokoll 2).....	22
Abb. 9: <i>In vivo</i> MAP2 Färbung am Rattenhirnschnitt als Beispiel für ein cytoplasmatisches Signal (1:100, 40x, Protokoll 2).....	22
Abb. 10: <i>In vivo</i> MAP2 Färbung am Rattenhirnschnitt als Beispiel für ein axonales Signal (1:200, 40x, Protokoll 1).....	22
Abb. 11: Gesamt-JNK in Primärkultur von cortikalen Neuronen (1:100 (grün), DAPI (blau), 20x, Protokoll 1).....	24
Abb. 12: Gesamt-JNK an Primärkultur von cortikalen Neuronen (1:100 (grün), DAPI (blau), 63x, Protokoll 1).....	24
Abb. 13: phospho-JNK an Primärkultur von cortikalen Neuronen (1:100 (grün), DAPI (blau), 63x, Protokoll 1).....	24
Abb. 14: JNK 1 an Primärkultur von cortikalen Neuronen (1:100 (rot), DAPI (blau), 63x, Protokoll 1).....	26
Abb. 15: JNK 2/3 an Primärkultur von cortikalen Neuronen (1:100 (grün), DAPI (blau), 63x, Protokoll 1).....	26
Abb. 16: JNK 1(rot)/phospho-JNK (grün) Doppelfärbung an Primärkultur von cortikalen Neuronen, DAPI (blau); 63x; Protokoll 1).....	26
Abb. 17: Vergrößerte Darstellung der JNK-Isoformen an primären cortikalen Neuronen.....	27

Abb. 18: JNK 1 in WT, 1: 100, 40x, Protokoll 1.....	28
Abb. 19: JNK 1 in JNK 1 -/-, 1:100, 40x, Protokoll 1.....	28
Abb. 20: JNK 1 in WT, 1:100, 40x; DAB-Protokoll.....	28
Abb. 21: JNK 1 in JNK 1 -/-, 1:100, 40x, DAB-Protokoll.....	28
Abb. 22: JNK 2 in WT, 1:100, 40x, Protokoll 1.....	28
Abb. 23: JNK 2 in JNK 2 -/-, 1:100, 40x, Protokoll 1.....	28
Abb. 24: JNK 2 in WT, 1:100, 40x, DAB-Protokoll.....	29
Abb. 25: JNK 2 in JNK 2 -/-, 1:100, 40x, DAB-Protokoll.....	29
Abb. 26: JNK 3 in WT, 1:100, 40x, Protokoll 1.....	29
Abb. 27: JNK 3 in JNK 3 -/-, 1:100, 40x, Protokoll 1.....	29
Abb. 28: JNK 3 in WT, 1:100, 40x, DAB-Protokoll.....	29
Abb. 29: JNK 3 in JNK 3 -/-, 1:100, 40x, DAB-Protokoll.....	29
Abb. 30: <i>In vivo</i> Gesamt-JNK- Färbung am Rattenhirnschnitt (1:50 (grün), DAPI (blau), 40x; Protokoll 1).....	31
Abb. 31: <i>In vivo</i> JNK 1 Färbung am Rattenhirnschnitt (1:100 (rot), DAPI (blau), 40x, Protokoll 1).....	31
Abb. 32: <i>In vivo</i> JNK 2 Färbung am Rattenhirnschnitt (1:50 (rot), DAPI (blau), 40x; Protokoll 1).....	31
Abb. 33: <i>In vivo</i> JNK 2/3 Färbung am Rattenhirnschnitt (1:200 (grün), DAPI (blau), 40x; Protokoll 1).....	32
Abb. 34: <i>In vivo</i> JNK 1 Färbung am Rattenhirnschnitt, 1:100, 40x, DAB-Protokoll.....	32
Abb. 35: <i>In vivo</i> JNK 2/3 Färbung am Rattenhirnschnitt, 1:600, 40x, DAB-Protokoll.....	32
Abb. 36: <i>In vivo</i> JNK 3 Färbung am Rattenhirnschnitt, 1:600, 40x, DAB-Protokoll.....	32
Abb. 37: <i>In vivo</i> JNK 2/3 Färbung am Rattenhirnschnitt nach MCAO, 1:50 (grün), DAPI (blau), 40x, Protokoll 1, Kontralaterale Seite, JNK 2/3 im Cytoplasma.....	33
Abb. 38: <i>In vivo</i> JNK 2/3 Färbung am Rattenhirnschnitt nach MCAO, 1:50 (grün), DAPI (blau), 40x, Protokoll 1, Betroffene Seite, JNK 2/3 transloziert vermehrt in den Nukleus.....	33

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Expression und Induktion von JNK-Isoformen.....	5
Tabelle 2: Ausgewählte Veröffentlichungen der JNK-Isoformen und phospho-JNK <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	7
Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse der JNK-Isoformen basal.....	34
Tabelle 4: Bisherige Veröffentlichungen immunhistochemischer Färbungen mit ATF-2	36
Tabelle 5: Beispiele für Veröffentlichungen immunhistochemischer Färbungen mit c-Jun..	37
Tabelle 6: Bisherige Veröffentlichungen immunhistochemischer Färbungen mit ATF-3.....	38
Tabelle 7: Immunhistochemische Darstellung von TOM20.....	39
Tabelle 8: Immunhistochemische Darstellung von GRP 75.....	39
Tabelle 9: Beispiele für Veröffentlichungen immunhistochemischer Färbungen mit MAP-2.....	40
Tabelle 10: Bisherige Veröffentlichungen immunhistochemischer Färbungen der JNK- Isoformen und phospho-JNK an Kultur primärer kortikaler Neuronen.....	42
Tabelle 11: Veröffentlichungen immunhistochemischer JNK-Isoform-Färbungen an Wildtyp- Mäusen.....	45
Tabelle 12: Veröffentlichungen immunhistochemischer <i>in vivo</i> Färbungen der JNK-Isoformen und phospho-JNK in der Ratte.....	46
Tabelle 13: Bisherige Veröffentlichungen immunhistochemischer Färbungen von JNK 2/3 mit Translokation nach Stress.....	48

8. Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode:	Avidin-Biotin-Complex-Methode
AP-1:	activator protein 1
ASK 1:	Arabidopsis thaliana SKP1-ähnliches Protein 1
ATF-2:	activating transcription factor 2
ATF-3:	activating transcription factor 3
BSA:	Bovine Serum Albumin
COS-7:	Fibroblasten-Zelllinie
DAB:	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI:	4',6-Diamidino-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff für DNA

ELK-1:	Ets domain protein-1
ERK:	Extrazellulär Signal-regulierte Kinase
G-Protein:	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRP 75:	Glucose-regulated protein 75
HNE:	4-hydroxy-2,3-nonenal
IL-1:	Interleukin-1
IR:	Immunreaktivität
JIP:	JNK-interacting-protein
JNK:	c-Jun N-terminale Kinasen
KO:	Knockout
MAP:	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
MAP2:	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MAPK:	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MAP3K:	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MCAO:	Middle cerebral artery occlusion (Verschluss der A. cerebri media)
MLK:	Myosinleichtketten
SAPK:	Stress-aktivierte Proteinkinase
TNF:	Tumornekrosefaktor
NFAT4:	nuclear factor of activated T- cells
NGS:	Normal Goat Serum
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PBST:	Phosphate Buffered Saline Triton
POSH:	Plenty of SH3s
REF-52:	Ratten-Embryo-Fibroblasten
TAK 1:	TGF- β -activated kinase-1
TBS:	Tris Bufferers Saline
TBST:	0,1% Polysorbat 20 in TBS
TOM 20:	„Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane“
WT:	Wildtyp

9. Literaturverzeichnis

- Björkblom B., Ostman N., Hongisto V., Komarovski V., Filén J. J., Nyman T. A., Kallunki T., Courtney M. J., Coffey E. T. (2005). "Constitutively active cytoplasmic c-Jun N-terminal kinase 1 is a dominant regulator of dendritic architecture: role of microtubule-associated protein 2 as an effector." J Neurosci. **25**(27): 6350-61.
- Borsello T., Forloni G. (2007). "JNK signalling: a possible target to prevent neurodegeneration." Curr Pharm Des. **13**(18): 1875-86.
- Brecht S., Kirchhof R., Chromik A., Willesen M., Nicolaus T., Raivich G., Wessig J., Waetzig V., Goetz M., Claussen M., Pearse D., Kuan C. Y., Vaudano E., Behrens A., Wagner E., Flavell R. A., Davis R. J., Herdegen T. (2005). "Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain." Eur J Neurosci **21**(2): 363-77.
- Camandola S., Poli G., Mattson M. P. (2000). "The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal increases AP-1-binding activity through caspase activation in neurons." J Neurochem. **74**(1): 159-68.
- Chang A., Smith M. C., Yin X., Fox R. J., Staugaitis S. M., Trapp B. D. (2008). "Neurogenesis in the chronic lesions of multiple sclerosis." Brain. **131**(9): 2366-75.
- Chang L., Jones Y., Ellisman M. H., Goldstein L. S., Karin M. (2003). "JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins." Dev Cell **4**(4): 521-33.
- Chang L. und Karin M. (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." Nature **410**(6824): 37-40.
- Coffey E. T., Smiciene G., Hongisto V., Cao J., Brecht S., Herdegen T., Courtney M. J. (2002). "c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) 2/3 is specifically activated by stress, mediating c-Jun activation, in the presence of constitutive JNK1 activity in cerebellar neurons." J Neurosci **22**(11): 4335-45.
- Dean D. J. und Cartee G. D. (2000). "Calorie restriction increases insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor and insulin receptor substrate-1 in rat skeletal muscle." Acta Physiol Scand **169**(2): 133-9.
- Dong Z., Zhou L., Del Villar K., Ghanevati M., Tashjian V., Miller C. A. (2005). "JIP1 regulates neuronal apoptosis in response to stress." Brain Res Mol Brain Res **134**(2): 282-93.
- Douville E. und Downward J. (1997). "EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2." Oncogene **15**(4): 373-83.

- Eminel S., Roemer L., Waetzig V., Herdegen T. (2008). "c-Jun N-terminal kinases trigger both degeneration and neurite outgrowth in primary hippocampal and cortical neurons." J Neurochem. **104**(4): 957-69.
- Ferrer I., Friguls B., Dalfó E., Planas A. M. (2003). "Early modifications in the expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated kinases SAPK/JNK and p38, and their phosphorylated substrates following focal cerebral ischemia." Acta Neuropathol. **105**(5): 425-37.
- Figueroa-Masot X. A., Hetman M., Higgins M. J., Kokot N., Xia Z. (2001). "Taxol induces apoptosis in cortical neurons by a mechanism independent of Bcl-2 phosphorylation." J Neurosci. **21**(13): 4657-67.
- Gupta S., Barret T., Whitmarsh A. J., Cavanagh J., Sluss H. K., Dérjard B. and Davis R. J. (1996). "Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors." EMBO J. **15**(15(11)): 2760–2770.
- Herdegen T., Blume A., Buschmann T., Georgakopoulos E., Winter C., Schmid W., Hsieh T. F., Zimmermann M., Gass P. (1997). "Expression of activating transcription factor-2, serum response factor and cAMP/Ca response element binding protein in the adult rat brain following generalized seizures, nerve fibre lesion and ultraviolet irradiation." Neuroscience. **81**(1): 199-212.
- Herdegen T., Leah J. D., Manisali R., Bravot R., Zimmermann M. (1991). "c-Jun-like Immunoreactivity in the CNS of the adult rat: basal and transynaptically induced expression of the immediate-early gene." Neuroscience **41**(2-3): 643-654.
- Herdegen T., Leah J. D. (1998). "Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins." Brain Res Brain Res Rev. **28**(3): 370-490.
- Hsu W. M., Lee H., Juan H. F., Shih Y. Y., Wang B. J., Pan C. Y., Jeng Y. M., Chang H. H., Lu M. Y., Lin K. H., Lai H. S., Chen W. J., Tsay Y. G., Liao Y. F., Hsieh F. J. (2008). "Identification of GRP75 as an independent favorable prognostic marker of neuroblastoma by a proteomics analysis." Clin Cancer Res. **14**(19): 6237-45.
- Jiang Q., Gu Z., Zhang G. (2002). "Activation, involvement and nuclear translocation of c-Jun N-terminal protein kinase 1 and 2 in glutamate-induced apoptosis in cultured rat cortical neurons." Brain Res. **956**(2): 194-201.
- Kallunki T., Deng T., Hibi M., Karin M. (1996). "c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions." Cell. **87**(5): 929-39.

- Kanaji S., Iwahashi J., Kida Y., Sakaguchi M., Mihara K. (2000). "Characterization of the Signal that Directs Tom20 to the Mitochondrial Outer Membrane." J Cell Biol. **151**(2): 277-88.
- Kuan C. Y., Whitmarsh A. J., Yang D. D., Liao G., Schloemer A. J., Dong C., Bao J. Banasiak K. J., Haddad G. G., Flavell R. A., Davis R. J., Rakic P. (2003). "A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 15184-9.
- Kuan C., Yang D. D., Samanta Roy D. R., Davis R. J., Rakic P., Flavell R. A. (1999). "The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development." Neuron **22**(4): 667-76.
- Kyriakis J. M., Avruch J. (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." Physiol Rev. **81**(2): 807-69.
- Leah J. D., Herdegen T., Bravo R. (1991). "Selective expression of Jun proteins following axotomy and axonal transport block in peripheral nerves in the rat: evidence for a role in the regeneration process." Brain Res. **566**(1-2): 198-207.
- Lee J. K., Park J., Lee Y. D., Lee S. H., Han P. L. (1999). "Distinct localization of SAPK isoforms in neurons of adult mouse brain implies multiple signaling modes of SAPK pathway." Brain Res Mol Brain Res. **70**(1): 116-24.
- Lindwall C., Dahlin L., Lundborg G., Kanje M. (2004). "Inhibition of c-Jun phosphorylation reduces axonal outgrowth of adult rat nodose ganglia and dorsal root ganglia sensory neurons." Mol Cell Neurosci. **27**(3): 267-79.
- Luo J. L., Tong W. M., Yoon J. H., Hergenhahn M., Koomagi R., Yang Q., Galendo D., Pfeifer G. P., Wang Z. Q., Hollstein M. (2001). "UV-induced DNA damage and mutations in Hupki (human p53 knock-in) mice recapitulate p53 hotspot alterations in sun-exposed human skin." Cancer Res **61**(22): 8158-63.
- McCubrey J. A., Steelman L. S., Moyer P. W., Hoyle P. E., Weinstein-Oppenheim C., Chang F., Pearce M., White M. K., Franklin R., Blalock W. L. (2000). "Effects of deregulated RAF and MEK1 expression on the cytokine-dependency of hematopoietic cells." Adv Enzyme Regul **40**: 305-37.
- Meeker R. und Fernandes A. (2000). "Osmotic and glutamate receptor regulation of c-Jun NH(2)-terminal protein kinase in neuroendocrine cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **279**(3): E475-86.

- Mizzen L. A., Chang C., Garrels J. I., Welch W. J. (1989). "Identification, characterization, and purification of two mammalian stress proteins present in mitochondria, grp 75, a member of the hsp 70 family and hsp 58, a homolog of the bacterial groEL protein." J Biol Chem. **264**(34): 20664-75.
- Nakagomi S., Suzuki Y., Namikawa K., Kiryu-Seo S., Kiyama H. (2003). "Expression of the activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and Akt activation." J Neurosci **23**(12): 5187-96.
- Nieto-Bodelón M., Santpere G., Torrejón-Escribano B., Puig B., Ferrer I. (2006). "Expression of transcription factors c-Fos, c-Jun, CREB-1 and ATF-2, and caspase-3 in relation with abnormal tau deposits in Pick's disease." Acta Neuropathol. **111**(4): 341-50.
- Ohba N., Maeda M., Nakagomi S., Muraoka M., Kiyama H. (2003). "Biphasic expression of activating transcription factor-3 in neurons after cerebral infarction." Brain Res Mol Brain Res. **115**(2): 147-56.
- Patzer A., Zhao Y., Stöck I., Gohlke P., Herdegen T., Culman J. (2008). "Peroxisome proliferator-activated receptorsgamma (PPARgamma) differently modulate the interleukin-6 expression in the peri-infarct cortical tissue in the acute and delayed phases of cerebral ischaemia." Eur J Neurosci. **28**(9): 1786-94.
- Raingeaud J., Gupta S., Rogers J. S., Dickens M., Han J., Ulevitch R. J., Davis R. J. (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." J Biol Chem **270**(13): 7420-6.
- Shimokawara T., Yamada E., Masui K., Mishima K., Enomoto Y., Inoue K., Sakaki T., Ichijima K. (2002). "Changes in expression of p38 mitogen-activated protein kinase in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve and hypoglossal nucleus after axotomy in adult rats." Neuropathology. **22**(4): 261-8.
- Tararuk T., Ostman N., Li W., Björkblom B., Padzik A., Zdrojewska J., Hongisto V., Herdegen T., Konopka W., Courtney M.J., Coffey E.T. (2006). "JNK1 phosphorylation of SCG10 determines microtubule dynamics and axodendritic length." J Cell Biol. **173**(2): 265-77.
- Vlug A. S., Teuling E., Haasdijk E. D., French P., Hoogenraad C. C., Jaarsma D. (2005). "ATF3 expression precedes death of spinal motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis-SOD1 transgenic mice and correlates with c-Jun phosphorylation, CHOP

- expression, somato-dendritic ubiquitination and Golgi fragmentation." Eur J Neurosci. **22**(8): 1881-94.
- Wadhwa R., Taira K., Kaul S. C. (2002). "An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where?" Cell Stress Chaperones. **7**(3): 309-16.
- Waetzig V. und Herdegen T. (2003). "A single c-Jun N-terminal kinase isoform (JNK3-p54) is an effector in both neuronal differentiation and cell death." J Biol Chem **278**(1): 567-72.
- Waetzig V. und Herdegen T. (2005). "Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage." Trends Pharmacol Sci **26**(9): 455-61.
- Waetzig V., Zhao Y., Herdegen T. (2006). "The bright side of JNKs-Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration." Prog Neurobiol **80**(2): 84-97.
- Widmann C., Gibson S., Jarpe M. B., Johnson G. L. (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." Physiol Rev **79**(1): 143-80.
- Yoon S., Choi J., Yoon J., Huh J. W., Kim D. (2005). "Okadaic acid induces JNK activation, bcl-2 overexpression and mitochondrial dysfunction in cultured rat cortical neurons." Neurosci Lett. **394**(3): 190-5.
- Zhang Y., Zhou L., Miller C. A. (1998). "A splicing variant of a death domain protein that is regulated by a mitogen-activated kinase is a substrate for c-Jun N-terminal kinase in the human central nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A. **95**(5): 2586-91.
- Zhou Q., Lam P., Han D., Cadenas E. (2007). "c-Jun N-terminal kinase regulates mitochondrial bioenergetics by modulating pyruvate dehydrogenase activity in primary cortical neurons." J Neurochem. **104**(2): 325-35.
- Zhu X., Castellani R. J., Takeda A., Nunomura A., Atwood C. S., Perry G., Smith M.A. (2001). "Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer disease: the 'two hit' hypothesis." Mech Ageing Dev. **123**(1): 39-46.
- Zhu X., Raina A. K., Rottkamp C. A., Aliev G., Perry G., Bux H., Smith M. A. (2001). "Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease." J Neurochem **76**(2): 435-41.

10. Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. T. Herdeggen für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung meiner Doktorarbeit. Seine intensive und geduldige Betreuung hat mich immer wieder motiviert und ganz wesentlich zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Zhao Yi, die mir beim Einstieg in die Thematik hilfreich zur Seite gestanden hat.

Ein ganz besondere Dank gilt Herrn R. Böhm, auf den ich mich immer und überall verlassen konnte. Er hat mich mit Ratschlägen und Hilfen unterstützt und das zumeist auf erfrischend humorvoller Basis.

Den Mitarbeitern im Labor möchte ich ein besonderes Dankeschön sagen für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern danken, ohne deren Unterstützung das alles nie möglich gewesen wäre.

11. Lebenslauf

Juliane Tonner

Geb. 09.12.1979, Kiel
Staatsangehörigkeit: deutsch
Ledig

Seit 01.03.2009 **Assistenzärztin** in der Abteilung für Innere Medizin im Kreiskrankenhaus Rendsburg

Hochschulausbildung

2002 - 2008 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts Universität zu Kiel

08/2004 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 3,0

11/08 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 2,0

Promotion

Seit 10/05 Experimentelle Arbeit zum Thema „Immunhistochemische Darstellung der JNK-Isoformen“, Institut für Pharmakologie, UKSH Campus Kiel, Doktorvater Prof. Dr. T. Herdegen, geplanter Abschluss Februar 2009

Praktisches Jahr

08/07 - 10/07 Chirurgische Abteilung (Department of cardiothoracic surgery) des Royal Prince Alfred Hospital, University of Sydney, Australien

10/07 - 12/07 Chirurgische Klinik des Städtischen Krankenhauses, Kiel

12/07 - 04/08 Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Diakonissenkrankenhauses Flensburg

04/08 - 07/08 1. Medizinische Klinik, UK-SH, Campus Kiel

Famulaturen

02/05 - 03/05 Chirurgische Abteilung, Asklepios Nordseeklinik, Sylt

08/05 Abteilung für Innere Medizin, Schlosspark-Klinik, Berlin

03/06 Abteilung für Anästhesie, Sankt Elisabeth Krankenhaus, Kiel

03/06 - 04/06 Praxis für Kinder- und Jugendheilkunde Harbs/Stoffregen, Kiel

08/06 - 09/06 Abteilung für Dermatologie, Krankenhaus Hietzing, Wien

09/06	Abteilung für Neurologie, Krankenhaus Hietzing, Wien
09/06 -10/06	Praxis für Allgemeinmedizin, Dr. Kloehn/ Dr. Möller, Kiel

Schulbildung

1986 – 1990	Grundschule- und Hauptschule Rammsee, Kiel
1990 – 1999	Max-Planck-Schule Kiel
1999	Abitur, Note: 1,8

Sonstige Berufsbildung

11/99 – 10/02	Johann Hermann Lubinus Schule, Schule für Physiotherapie, Kiel
10/02	Staatsexamen, Note: 1,6